ISSN 0181-1584

CRYPTOGAMIE

MYCOLOGIE

TOME 16 Fascicule 3 1995

PUBLICATION TRIMESTRIELLE

Septembre 1995

CRYPTOGAMIE
Mycologie

ANCIENNE REVUE DE MYCOLOGIE
Fondée par R. Heim en 1936

Directeur scientifique: Mme J. Nicot
Secrétaire de Rédaction: M. Bruno Dennetière
Editeur: A.D.A.C. - 12 rue Buffon F-75005 Paris

MANUSCRITS

Les manuscrits doivent être adressés directement à un membre du Bureau de Rédaction, choisi pour sa spécialité. Le Bureau peut demander l'avis d'un lecteur même s'il n'appartient pas au Comité de Lecture. Bien qu'étant une revue de langue française, les articles rédigés en anglais, allemand, italien et espagnol sont acceptés. Les disquettes de micro-ordinateurs (IBM, IBM compatible et MacIntosh) sont vivement souhaitées. Les recommandations aux auteurs sont publiées dans le fascicule 1 de chaque tome. Les auteurs recevront 25 tirés-à-part gratuits; les exemplaires supplémentaires seront à leur charge.

TARIFS DES ABONNEMENTS Tome 17, 1996

CRYPTOGAMIE comprend trois sections: Algologie, Bryologie-Lichénologie, Mycologie.

Pour une section:	France:	(350 F ht)	357,35 F ttc	Étranger:	380,00 F
Pour les 3 sections:	France:	(950 F ht)	970,00 F ttc	Étranger:	1050,00 F

Paiement par chèque bancaire ou postal à l'ordre de

A.D.A.C. - CRYPTOGAMIE (CCP La Source 34 764 05 S)

adressé à: A.D.A.C. 12 rue Buffon, F-75005 Paris.

CRYPTOGAMIE, Mycologie est indexé par *Biological Abstracts, Current Contents, Geo Abstracts,* GEOBASE, Publications bibliographiques du CNRS (Pascal).

CRYPTOGAMIE

MYCOLOGIE

TOME 16 FASCICULE 3 1995

CONTENTS





Cryptogamie, Mycol., 1995, 16 (3): 141-183

LES ASSOCIATIONS MUTUALISTES ENTRE CHAMPIGNONS ET PHOTOTROPHES: LEUR DIVERSITE ET LEUR RÔLE DANS LA COLONISATION DU MILIEU TERRESTRE

M.-A. SELOSSE[1] et F. LE TACON

INRA Centre de Nancy
Laboratoire de Microbiologie Forestière, Forêt d'Amance
F-54280 Champenoux France

RÉSUMÉ

L'évolution des phototrophes comporte l'émergence répétée d'associations mutualistes avec les champignons:
les Cyanophytes forment de nombreux lichens; les Rhodophytes établissent de rares mycophycobioses (associations macroalgue + champignon); les Chromophytes (Xantophytes, Phéophytes) forment des mycophycobioses et de rares lichens; les Chlorophytes et les Archégoniates, qui en descendent, interagissent de façon récurrente avec des partenaires fongiques, formant lichens, mycophycobioses, mycothalles, mycorhizomes, mycophylles et mycorhizes.

Les groupes de champignons impliqués dans ces associations sont:
- les Glomales, groupe biotrophe d'affinité systématique discutée (Zygomycètes ?), formant notamment les endomycorhizes à vésicules et arbuscules. Ils sont connus comme biotrophes dès le Paléozoïque et pratiquement inchangés depuis lors, probablement en raison de la stabilité de leur niche écologique;
- des champignons supérieurs: Ascomycètes, chez qui le mutualisme pourrait être ancestral (lichens), et Basidiomycètes dans l'évolution desquels le mutualisme émerge plus récemment, probablement à plusieurs reprises après le Crétacé, au sein de groupes de parasites ou de saprophytes.

Ces interactions sont quasi systématiques dans les groupes phototrophes qui ont conquis le milieu terrestre. Elles permettent en effet l'adaptation à ce milieu. D'une part en cumulant au sein de l'association les capacités absorptives du partenaire fongique (mycobionte) et les capacités photosynthétiques du phototrophe (photobionte). D'autre part en favorisant des innovations évolutives, morphologiques, au niveau du partenaire externe (mycobionte des lichens, photobionte pluricellulaire) en relation avec l'optimisation de l'exploitation des ressources, et biochimiques (acides lichéniques, phytoalexines...) en relation avec la protection contre les agents abiotiques (ultra-violets, éléments toxiques,...) ou biotiques du milieu.

Les associations réalisées ont eu un plus ou moins grand succès évolutif en milieu terrestre:
- les microalgues sont probablement sorties des eaux à l'état non-mutualiste et sont devenues secondairement mutualistes en formant des lichens. Les lichens, qui n'ont pas été, sous leur forme actuelle, les premiers colonisateurs du milieu terrestre, ont aujourd'hui un grand rôle pionnier - mais leur potentialités évolutives sont limitées par les faibles potentialités morphogénétiques des faux-tissus du mycobionte;

---

(1) M.-A. Selosse effectue une formation complémentaire par la recherche dans le cadre de l'Ecole Nationale du Génie Rural, des Eaux et Forêts.

- les potentialités biochimiques des macroalgues sont certainement limitantes dans le cas des mycophycobioses actuelles, mais des mycophycobioses à Chlorophytes ont pu être à l'origine des Archégoniates;
- le caractère mutualiste semble ancestral parmi les végétaux terrestres pluricellulaires et parenchymateux (Archégoniates) et est connu dès le Dévonien. Le caractère non-mutualiste aurait été acquis secondairement par certains Archégoniates. On distingue: les mycothalles des Hépatophytes et des Anthocérotophytes, groupes dont l'évolution a pu être limitée par les modalités de reproduction et la ploïdie du photobionte; les Bryophytes non mutualistes, dont la stratégie poïkilohydrique, ajoutée à leur ploïdie, limite les potentialités évolutives; les mycothalles, mycorhizomes et mycorhizes des Trachéophytes, qui, avec d'autres types d'associations plus ou moins systémiques acquises plus récemment, permettent à ces végétaux d'adopter une stratégie homéohydrique dans des milieux très divers, quelles qu'en soient les ressources minérales.

SUMMARY

Evolution of phototrophs shows repeated emergence of mutualistic associations with fungi: Cyanophyta are involved in lichens; Rhodophyta form some mycophycobiosis (associations between macroalga and fungus); Chromophyta (Xanthophyta, Phaeophyta) form some mycophycobiosis and are involved in some lichens; Chlorophyta and their terrestrial descendants (Archegoniata) repeatedly interacted with fungi during their evolution, leading to lichens, mycophycobiosis, mycothallus, mycorhizomes, mycophyllas and mycorrhizas.

Fungi mutualists with phototrophs belong to:
- Glomales, a group of biotrophic fungi of uncertain systematic position (Zygomycotina ?), e.g. forming vesicular-arbuscular mycorrhizas. They have been recognized as biotrophs since Palaeozoic time; they have little changed since then probably by reason of the stability of the living medium they occupy.
- higher fungi: Ascomycotina whose mutualism may be ancestral (lichens) and Basidiomycotina whose mutualism may have arisen at multiple times after the Cretaceous, from saprotrophic and parasitic groups.

Those mutualistic associations are widespread in phototrophic groups inhabiting land ecosystems. They contribute to adaptation to terrestrial life by combining absorbing abilities of the fungus (mycobiont) and photosynthesising abilities of the phototrophs (photobiont); and also allowing evolutionary novelties: at the morphological level, the external symbiont (mycobiont in lichens, multicellular photobiont) may evolve to optimise exploitation of the medium, and at the biochemical level (lichen products, phytoalexins, etc.), to protect the association against both abiotic (ultraviolet rays, toxic substances, etc.) and biotic stresses.

Those associations had more or less evolutionary success in land colonisation:
- microalgae were probably non-mutualistic as they colonized emerged areas; they became secondarily mutualistic in lichens. Lichens involving higher fungi, as we know today, were not the first land inhabitants, but are pioneers in current ecosystems. Evolutionary novelties in this group were limited by the low morphogenetical ability of the fungal stroma;
- biochemical ability of macroalgae was probably limiting for current development of mycophycobiosis; however, Archegoniata may have arisen from a mycophycobiosis involving Chlorophyta;
- mutualism in terrestrial, multicellular and parenchymatous plants (Archegoniata) seems to be ancestral and occurred during Devonian. Non-mutualistic way of life in some Archegoniata seems to be secondary. We distinguish: mycothallus of Hepatophyta and Anthocerotophyta, whose evolution was limited by the reproduction and ploidy of the photobiont; non-mutualistic Bryophyta, whose poïkilohydric strategy and ploidy limited the diversification; mycothallus, mycorhizomes, mycorrhizas and other more systemic associations of Tracheophyta enable those plants to adopt a homeohydric strategy and to colonize various places with different mineral resources.

INTRODUCTION

La colonisation des terres émergées par des organismes phototrophes, c'est-à-dire capables de photosynthèse, remonte au Précambrien (Horodyski et Knauth, 1994), mais elle n'implique alors que des unicellulaires, probablement procaryotes. Il faut attendre le Silurien, il y a 400 Ma (Boureau *et al.*, 1978, Pratt *et al.*, 1978, Edwards & Fanning, 1985) pour trouver une flore terrestre au sens actuel, constituée de végétaux pluricellulaires, quoique des traces de végétation vasculaire aient été suggérées dès l'Ordovicien supérieur (vers - 470 Ma; Gray, 1985; Taylor & Taylor, 1993). Des structures caractéristiques, comme des stomates ou des cuticules, sont considérées comme le témoignage d'une vie semi-terrestre dès cette époque (voir l'échelle stratigraphique, tableau 4). Outre les problèmes liés à la reproduction en milieu aérien, que nous ne traiterons pas ici, le passage à la vie terrestre a exigé de nombreuses adaptations de l'appareil végétatif; le milieu terrestre est en effet très hostile pour un organisme aquatique.

Comme le souligne Jeffrey (1962), à propos du problème de la sortie des eaux: "*la sélection est opportuniste et ne peut planifier l'avenir; les pressions de sélection agissent au travers du phénotype du moment en modifiant le futur génotype. Les adaptations nécessaires à la vie en milieu terrestre ont dû avoir une valeur sélective dans l'environnement du moment où vivaient les phénotypes aquatiques originels*". Le problème posé est celui de l'adaptation au milieu terrestre: or, si l'on observe attentivement les phototrophes vivant en milieu terrestre actuellement, on observe que la plupart d'entre eux appartiennent en réalité à une association mutualiste impliquant un partenaire fongique. L'universalité du mutualisme phototrophes-champignons est-elle une simple coïncidence ?

Le rôle évolutif du mutualisme[1], association symbiotique étroite et à bénéfice mutuel entre deux organismes, a longtemps été négligé: il a pourtant été majeur, tant dans l'évolution de la cellule eucaryote (Margulis, 1993) que dans la diversification des organismes pluricellulaires (Le Tacon & Selosse, 1994). Le mutualisme permet d'effectuer un saut macroévolutif: des entités génétiques nouvelles formées par l'addition de deux génomes pré-existants peuvent "court-circuiter" le temps nécessaire à l'un des deux partenaires pour acquérir les potentialités de l'autre par sa propre évolution, et font apparaître quasi-instantanément de nouvelles propriétés inhérentes à l'association. La robustesse physiologique de certaines associations les rend capables de vivre et d'occuper des niches écologiques qu'aucun partenaire, pris séparément, ne tolérerait. A ce titre, bien des associations mutualistes ont un rôle pionnier.

Le mutualisme phototrophes-champignons est caractéristique du milieu terrestre, car il ne se retrouve guère en milieu aquatique, et disparaît assez fréquemment lors du retour au milieu aquatique de végétaux aériens (bien qu'il puisse parfois persister, Khan & Belik, 1995). Nous proposons qu'il ait été la clef de la réussite des phototrophes en milieu terrestre. Cette hypothèse a fréquemment été émise pour les Archégoniates dans la littérature anglo-saxonne (Jeffrey, 1962; Pirozynski & Malloch, 1975; Pirozynski, 1981; Malloch *et al.*, 1980 notamment). Nous nous proposons de montrer

(1) Dans cet article, nous considérons "symbiose" dans son acception anglo-saxonne, qui recouvre le mutualisme (association à bénéfice mutuel) et le parasitisme (bénéfice unilatéral).

que cette hypothèse s'étend largement à tous les phototrophes vivant en milieu terrestre, ou à la frontière entre milieu terrestre et milieu aquatique.

Nous analyserons donc ces associations mutualistes, en mettant en relief leurs adaptations à la vie en milieu terrestre et en étudiant leur ancienneté paléontologique, afin d'établir leur rôle dans la colonisation du milieu terrestre. Commençons par rappeler les problèmes posés par cette colonisation, et les réponses potentielles du mutualisme phototrophes-champignons.

COMMENT SORTIR DES EAUX ?

Difficultés liées à la vie végétative en milieu terrestre

Pendant une longue période, depuis -3500 Ma, la vie évolue uniquement en milieu aquatique et principalement marin. Dans ces conditions, l'alimentation minérale des cellules ne présente pas de difficultés particulières. Tous les éléments minéraux sont à l'état dissous et peuvent pénétrer de manière active ou passive à l'intérieur de la cellule. Les flux sont contrôlés par le plasmalemme, limite entre le milieu extérieur et le cytoplasme, mais il n'y a jamais réellement de barrière à ce niveau. Lorsqu'un élément est absorbé, sa concentration extérieure aux abords du plasmalemme est quasi immédiatement rétablie par simple diffusion à partir du milieu ambiant.

Les phototrophes, lorsqu'ils ont commencé à coloniser les terres émergées, ont dû résoudre plusieurs problèmes:

Le premier est celui de leur alimentation en eau. Dans les milieux terrestres, la disponibilité en eau est faible et présente des variations très importantes, avec des phases de quasi absence. De plus, le milieu terrestre est à l'interface entre un substrat lithique, et un milieu aérien pourvoyeur de photons et de gaz en grande quantité. Si gaz (oxygène et gaz carbonique) et lumière sont plus disponibles qu'en milieu aquatique, l'interface avec un milieu gazeux présente pour les végétaux l'inconvénient d'être déssèchant et nécessite la mise en place d'un système de contrôle.

Le second est celui de leur alimentation minérale. Dans les sols, et plus encore sur les matériaux primitifs non évolués, certains éléments minéraux sont essentiellement présents sous forme de complexes insolubles dans l'eau et par conséquent peu accessibles: c'est le cas du phosphore, présent sous forme de phosphates peu solubles. De plus, il n'existe pas d'azote minéral dans les roches, qu'elles soient ignées, métamorphiques ou sédimentaires. Les procaryotes qui peuplaient les roches émergées avaient probablement initié un cycle de l'azote rudimentaire et peu intense. Aussi, avant l'apparition de sols riches en matière organique et de micro-organismes recycleurs, la source azotée majeure était l'azote atmosphérique N_2. Celui-ci n'est pas accessible aux eucaryotes, chez qui aucun dispositif non mutualiste de fixation de l'azote n'est connu. Localement, sur les rivages, la minéralisation des restes organiques marins (laisses) peut constituer un apport d'azote.

D'autre part la lumière atmosphérique est plus riche en ultraviolets que la lumière filtrée par l'eau. La sortie de l'eau a donc nécessité la mise en place de mécanismes photoprotecteurs efficaces.

Le milieu terrestre est beaucoup moins tamponné thermiquement que le milieu aquatique et se caractérise par des écarts de température rapides et de grande amplitude.

Observons maintenant en quoi l'émergence de l'association phototrophe-champignon permet de répondre à ces contraintes. Les avantages adaptatifs de telles associations tiennent bien sûr à l'addition des capacités des deux partenaires, mais aussi à la mise en place de capacités propres à l'association. C'est dans ces trois types de potentialités que réside l'adaptation au milieu terrestre de l'association.

Le partenaire phototrophe (photobionte)

Le phototrophe (Cyanophyte ou Algue eucaryote, tableau 1) optimise déjà, en milieu aquatique, les échanges gazeux et la collecte de photons, qui exigent une **maximisation de la surface d'échange**. Il peut donc exploiter les ressources atmosphériques du milieu terrestre. Des phototrophes procaryotiques, peu différenciés, ont d'ailleurs colonisé le milieu terrestre dès le Précambrien (Horodyski & Knauth, 1994), occupant les interstices du milieu lithique - comme certaines cyanobactéries ou certaines algues unicellulaires eucaryotes actuellement.

Mais cette première tentative de sortie des eaux n'a pas débouché sur l'émergence de plans d'organisation nouveaux et n'a donc pas eu de suite évolutive. Ce sont des organismes pluricellulaires, plus ou moins différenciés, qui dominent actuellement la flore terrestre. Ceux-ci sont en réalité mutualistes (le phototrophe est alors appelé photobionte, ou "phycobionte" par les lichénologues), et organisés soit par les faux tissus du champignon (cas des lichens), soit par les parenchymes du photobionte s'il est pluricellulaire (cas des Archégoniates). L'existence de parenchymes offre en effet des potentialités morphogénétiques qui rendent possible une complexification morphologique, et notamment, la création d'organes plus particulièrement dévolus aux échanges avec le sol ou avec l'atmosphère. Certains auteurs ont proposé que les ancêtres des Archégoniates aient été des algues unicellulaires terrestres, mieux adaptées à la vie en conditions hostiles (Stebbins & Hill, 1980). Ces auteurs postulent que l'acquisition ultérieure de l'état pluricellulaire ait pu être, précisement, une adaptation au milieu terrestre. L'association avec un partenaire fongique aurait pu jouer un rôle lors de la transition vers l'état pluricellulaire, dans un second temps donc. Tout laisse néanmoins supposer que les ancêtres des Archégoniates étaient déjà pluricellulaires, auquel cas l'association pourrait avoir été contemporaine de la sortie des eaux.

Le partenaire fongique (mycobionte)

Les partenaires sont de deux types: les uns se rattachent aux champignons supérieurs et possèdent des hyphes septés (Ascomycètes ou Basidiomycètes et leurs formes imparfaites); les autres ont des hyphes non septés: ce sont les Glomales, dont près de 200 espèces ont été décrites (Trappe, 1982). Les Glomales semblent rattachés aux Zygomycètes: présence de zygospores chez les *Endogonaceae*, présence de chitine dans la paroi (Weijman & Meuzelaar, 1979). Toutefois, ce rattachement est discuté par certains auteurs (voir l'analyse de Pirozynski et Malloch 1975 et Pirozynski et Dalpé 1989) qui rapportent au moins certaines espèces d'endomycorhiziens aux Oomycètes, d'affinités évolutives différentes des champignons vrais (Cavalier-Smith, 1987). La

TABLEAU 1: Organismes phototrophes établissant des relations mutualistes avec des champignons dans la flore actuelle (= mycobiontes).

NOMENCLATURE RETENUE	SYNONYME	MYCOBIONTES(0)
PROCARYOTES		
Cyanophytes(1)	Cyanobactéries, ou Cyanophycées	S, (NS)
EUCARYOTES		
Rhodophytes(1)	Algues rouges	S
Chromophytes(1)		
Phéophytes	Algues brunes	S
Xanthophytes	Algues vert-jaune	S
Chlorophytes(1)	Algues vertes	S
Archégoniates	Embryophytes	
Hepatophytes(2)	Hépatiques	S, NS
Anthocérotophytes(2)	Anthocérotes	NS
Psilophytes(3)(4)	Psilotes	S, NS
Lycophytes(3)(4)	Lycopodes et Sélaginelles	S, NS
Sphénophytes(3)(4)	Prêles	S, NS
Filicophytes(3)(4)	Fougères	S, NS
Préspermaphytes(4)	Plantes à pré-graines	NS
Spermaphytes(4)	Plantes à graines	
Chlamydospermes	Pl. à sac ovulé	S, NS
Gymnospermes	Conifères	S, NS
Angiospermes	Plantes à fleurs	S, NS

(0) Partenaires fongiques décrits à ce jour: NS, partenaires à hyphes non septés; S, partenaires à hyphes septés (Ascomycètes ou Basidiomycètes).
(1) Algues au sens large.
(2) appartiennent aux Bryophytes, sens large (= *Atrachaeta* de certains auteurs - dans le texte, Bryophyte, utilisé au sens strict, désigne les mousses).
(3) Ptéridophytes.
(4) Trachéophytes (végétaux vasculaires).

discussion du monophylétisme et de l'appartenance systématique des Glomales sort du cadre de cette revue. D'ailleurs, tant par leur morphologie que par leur place dans les écosystèmes, les Oomycètes se rapprochent assez des champignons vrais pour qu'en première approximation, nous ne les distinguions pas dans notre propos. Des Oomycètes du genre *Pythium* ont d'ailleurs été indentifiés comme mycobiontes (Hepden, 1960; Carré & Harrisson, 1961). L'analyse des fossiles ne permettra pas de trancher sur la systématique des structures fongiques observées. C'est pourquoi nous avons choisi de parler évasivement de "champignons non septés" (Zygomycètes et Oomycètes), par opposition aux champignons septés (Ascomycètes, Basidiomycètes et leurs formes imparfaites).

Les champignons présentent une adaptation à la vie en milieu terrestre qui est complémentaire de celle des phototrophes. Ils sont absorbotrophes et réalisent donc une

maximisation du volume exploré, bien adaptée à l'exploitation des ressources édaphiques:

- Ils peuvent développer des surfaces de contact très importantes par simple prolifération des hyphes. La forme filamenteuse, plus que la forme parenchymateuse, est adaptée à l'exploration de grands volumes de substrats. Harley (1989) l'illustre par un simple calcul: en supposant qu'un hyphe [redacted] un rayon 100 fois plus petit qu'une radicelle, son rapport surface / volume est 100 fois plus grand. En d'autre termes, il faut 100 fois moins de matériel biologique pour créer la même surface d'absorption.
- Les champignons augmentent leurs capacités d'exploration du milieu par la production d'exoenzymes.
- Les hyphes ont d'autre part la capacité d'excréter dans le milieu extérieur des quantités importantes de protons qui désorganisent les réseaux cristallins (Lapeyrie *et al.*, 1991). Les éléments minéraux sont ainsi libérés des réseaux cristallins et passent de la forme insoluble à la forme soluble. De plus, la plupart des champignons excrète dans le milieu extérieur de grandes quantités d'acides organiques, et en particulier de l'acide oxalique (Lapeyrie, 1988, 1990). L'acide oxalique est un puissant chélatant qui piège les cations comme le calcium, libérant ainsi le phosphate.
- Enfin, les champignons possèdent aussi des formes de résistance à la sécheresse comme les spores ou les sclérotes. Actuellement, ils sont capables de vivre dans des conditions extrêmes d'aridité (Staley *et al.*, 1982), mais au prix d'une croissance très lente.

Il faut évoquer ici la thèse soutenue par certains auteurs, selon laquelle les champignons étaient primitivement pourvus de plastes et autotrophes (Church, 1921 a, b; Cain, 1972). Ils seraient sortis de l'eau à l'état autotrophe et auraient ensuite perdu leurs plastes. Cette théorie évoque celle d'une communauté d'origine entre les Ascomycètes et les Rhodophytes, qui s'appuie sur des ressemblances dans les cycles de développement et des particularités cytologiques (Denisson & Carroll, 1966; Kohlmeyer, 1975; Chadefaud, 1972; Demoulin, 1974, 1985; Eriksson, 1981). Bien que l'individualisation des groupes de champignons au sein des Eucaryotes se produise après l'apparition des plastes (Knoll, 1992), il semble plus probable d'envisager un ancêtre commun hétérotrophe entre les champignons et les Choanoflagellés (Cavalier-Smith, 1987; Wainright *et al.*, 1993). Il faut peut-être faire une exception pour les Oomycètes (Cavalier-Smith, 1987), qui pourraient dériver de Chromophytes.

Aucun document fossile ne corrobore les spéculations sur l'autotrophie des premiers champignons, plus probablement biotrophes ou saprotrophes (Stubbelfield & Taylor, 1988; Pirozynski & Dalpé, 1989; Taylor, 1990, 1993; Remy *et al.*, 1994). Notons d'ailleurs que l'hétérotrophie des champignons en fait d'excellents recycleurs pour les premiers écosystèmes terrestres (bien que des bactéries puissent aussi avoir assuré ce rôle) et les pousse naturellement à établir des relations (même parasitaires) avec les producteurs primaires que sont les phototrophes. Selon Harley (1989), un quart des champignons septés connus est mutualiste.

L'association mutualiste

Dans l'association, le mycobionte assure la nutrition minérale et hydrique tandis que le photobionte assure l'apport d'énergie lié à la photosynthèse (fixation de carbone,

voire d'azote). L'augmentation de la capacité ("fitness") des partenaires ne résulte pas seulement d'échanges trophiques: l'interposition du mycobionte entre le sol et le photobionte permettra par exemple de limiter les effets de toxicité du substrat (comme dans le cas des mycorhizes - Lapeyrie, 1988, Bradley *et al.*, 1981) et la présence du mycobionte au sein du photobionte pourra en réduire le broutage par les herbivores (Caroll, 1988) ou favoriser les transferts. Enfin, les partenaires exercent l'un sur l'autre des actions modificatrices, notamment au niveau morphologique. Nous évoquerons ultérieurement ce point à propos de différents exemples.

D'autres possibilités émergent aussi, propres à l'association: un exemple actuel est la synthèse d'acides lichéniques par les lichens (Hawksworth, 1988a; Ahmadjian, 1992), produits par le métabolisme fongique exclusivement en présence de l'algue (pour les rôles de ces substances dans l'augmentation de la capacité ("fitness") de l'association, voir l'analyse de Lawrey, 1986). De même, les phytoalexines, antifongiques des Trachéophytes dont la production est notamment élicitée par la présence du mycobionte (Volpin *et al.*, 1994), pourraient avoir eu un rôle dans la photoprotection au cours des étapes précoces de la sortie des eaux. Il est frappant de constater que les phytoalexines induites de nos jours chez les végétaux supérieurs par les champignons et les ultraviolets courts sont souvent identiques (Ensminger, 1993). Tant par leur structure aromatique que par leurs fonctions, acides lichéniques et phytoalexines sont des composés semblables, produits du mutualisme. Plus généralement, les réactions des plantes actuelles aux stress paraissent assez peu variables [redacted] fonction du type de stress, biotique ou physique. La présence d'un mycobionte peut donc induire un état de stress permanent et non-spécifique. Cet état a pu favoriser un changement de niche écologique (par exemple, la sortie des eaux), les partenaires étant ainsi "prémunis" contre toutes les aggressions du nouveau milieu.

Nous allons examiner les diverses stratégies qui ont été utilisées par différents groupes de phototrophes pour coloniser le milieu terrestre. Pour chacun d'entre eux, (1) nous montrerons que l'**association avec des mycobiontes est fréquente, voire générale**, et (2) nous en étudierons l'**ancienneté paléontologique** (tableau 4). En premier lieu, nous nous intéresserons aux algues actuelles, en distinguant les microalgues (algues unicellulaire ou filamenteuses, mais toutes microscopiques) et les macroalgues (algues macroscopiques, souvent pseudo-parenchymateuses).

LA COLONISATION DU MILIEU TERRESTRE PAR LES MICROALGUES: LES LICHENS

Microalgues et lichens ont un rôle pionnier dans les processus de colonisation actuels

Les algues microscopiques ou microalgues, eucaryotes (Chlorophytes) ou procaryotes (Cyanophytes)[1], peuvent s'adapter avec succès à la vie en milieu terrestre,

---

(1) Par commodité, nous considérerons les Cyanophytes comme des microalgues: cette acception, discutable, se justifie par le rôle similaire des Algues eucaryotes et des Cyanophytes au sein des associations avec les champignons.

même sur substrat lithique (Stebbins et Hill, 1980). Pourtant, ce ne sont pas ces formes qui dominent aujourd'hui sur les substrats vierges, mais les lichens, associations mutualistes d'une microalgue et d'un mycobionte. Le plus souvent, les algues impliquées existent aussi à l'état aposymbiotique (toutes les Cyanophytes concernées, la plupart des Chlorophytes: Hawksworth, 1988a, Tschermak-Woess, 1988). Au sein des lichens, les algues voient leur morphologie ou leur taille varier. Les formes filamenteuses deviennent souvent unicellulaires, et c'est le stroma fongique qui détermine la morphologie de l'association, sauf, peut-être, dans le cas de thalles homéomères. Des contacts se mettent ainsi en place (Honegger, 1993 - voir tableau 2).

TABLEAU 2: Comparaison des associations mutualistes réalisées avec un partenaire fongique par les microalgues (lichens), les macroalgues (mycophycobioses) et les Archégoniates ("mycorhizes": mycothalles, mycorhizomes et mycorhizes au sens strict).

	LICHENS	MYCOPHYCOBIOSES	MYCORHIZES
PHOTOBIONTES	unicellulaires ou filamenteux stériles Cyanophytes Chlorophytes (Chromophytes)	pluricellulaires et pseudoparenchymateux fertiles (Rhodophytes) Chlorophytes Chromophytes	pluricellulaires et parenchymateux fertiles Archégoniates (tous sauf les Bryophytes)
MYCOBIONTES	Ascomycètes (Basidiomycètes) ((Zygomycètes)) inter- et parfois intra-cellulaires (suçoirs)	Ascomycètes intercellulaires stricts	Ascomycètes Basidiomycètes Glomales (et Oomycètes ?) inter- et/ou intra-cellulaires
HABITANT EXTERNE	fongique	algal	aérien: photobionte souterrain: variable
MILIEUX COLONISÉS	terrestres ou subaquatiques	zone intertidale	strictement terrestres
MÉTABOLISME	échange de polyols échange réciproque de vitamines acides lichéniques	échange d'oses (?) échange réciproque de vitamines	échange d'oses échange réciproque de vitamines, hormones phytoalexines
REPRODUCTION	asexuée et conjointe (reproduction sexuée du champignon)	sexuée et disjointe	sexuée et disjointe (sexualité régressée chez les Glomales)

Actuellement les lichens comptent parmi les principaux colonisateurs des zones inter- et supra-tidale, c'est-à-dire de l'interface entre le milieu terrestre et le milieu marin, et les premiers colonisateurs des matériaux éruptifs nouvellement produits. En raison de leur état mutualiste, les lichens sont particulièrement bien adaptés à ces milieux relativement hostiles (Topham, 1977). Cette association est la seule qui puisse survivre là où les autres végétaux terrestres atteignent leurs limites physiologiques. On retouve ainsi les lichens dans la toundra où températures extrêmes et fortes amplitudes

thermiques sont particulièrement limitantes. De ce point de vue, les communautés cryptendolithiques sont intéressantes. Elles vivent entre les cristaux de roches nues et translucides, dans les déserts froids de l'Antarctique (Friedmann, 1982) et sont constituées d'algues et de champignons plus ou moins étroitement associés en lichens. Selon Friedmann, ces communautés ne sont pas primitives mais "hautement adaptées": elles prouvent néanmoins que des associations champignons-algues peuvent réussir dans un milieu purement minéral et des conditions trophiques et physiques défavorables, alors que chacun des partenaires, pris isolément ne peut y parvenir.

Les lichens furent-ils, sous leur forme actuelle, les premiers colonisateurs du milieu terrestre ?

Les rochers nus représentent certainement un milieu proche de ceux qui ont été primitivement colonisés. Doit-on pour autant considérer, avec certains auteurs, pour qui les formes lichénisées sont ancestrales (Eriksson, 1981; Retallack, 1981; Hawkworth, 1990 par exemple), que les lichens ont compté parmi les premiers colonisateurs du milieu terrestre ? Intéressons-nous à la nature et à l'ancienneté de chacun des constituants. Le mycobionte est le plus souvent un Ascomycète. Environ 2% des lichens impliquent des Basidiomycètes, Agaricales ou Aphyllophorales, mais ceux-ci n'ont pas de rôle colonisateur. Dans 10% des lichens, le photobionte est une Cyanophyte; dans 85% des cas, c'est une Chlorophyte et dans 5% des cas, les deux types de photobiontes sont simultanément présents au sein du lichen (Gärtner, 1992). Ce dernier cas, appelé cyanotrophie, peut être facultatif ou obligatoire pour le mycobionte (Poelt & Mayrhofer, 1988). On connaît aussi des *Verrucaria* lichénisant une Xanthophyte (*Heterococcus*) ou une Phéophyte (*Pteroderma*) (Ahmadjian, 1967; Tschermak-Woess, 1988; Gärtner, 1992).

La diversité des groupes phototrophes incriminés suggère le polyphylétisme des lichens. Quant au mycobionte, l'acquisition de l'état mutualiste semble avoir eu lieu à plusieurs reprises - au moins par deux fois au sein des Ascomycètes et par trois fois au sein des Basidiomycètes, si l'on en croit la phylogénie moléculaire basée sur l'ADN ribosomal (Gargas *et al.*, 1995). Les lichens sont donc polyphylétiques (Lewis, 1987; Kendrick, 1991). Mais à quelle époque remontent les premiers lichens à Chlorophytes ou à Cyanophytes ?

Les groupes d'autotrophes formant des lichens, Chlorophytes et Cyanophytes, existent dès le Cambrien (Knoll, 1992; Conway Morris & Robinson, 1988). Le groupe des Ascomycètes est attesté au Carbonifère (Pirozynski, 1976; Stubbelfield & Taylor, 1988), ce qui est cohérent avec les données des horloges moléculaires. Berbee et Taylor (1993) envisagent l'existence d'un ancêtre commun aux Septomycètes il y a 400 Ma, au Silurien tardif. Les filaments septés d'affinité incertaine décrits dès le Silurien (Pratt *et al.*, 1978) pourraient être attribués à des fossiles d'ancêtres des Septomycètes, mais sans grande certitude. Les témoignages paléontologiques d'ascomycètes du Silurien (Sherwood-Pike *et al.*, 1985) et du Dévonien (Krassilov, 1981) nous paraissent trop isolés pour suggérer une origine antécarbonifère des Ascomycètes, donc des Ascolichens. C'est aussi l'avis de Berbee et Taylor (1992). Aucun fossile de lichen n'est en fait connu avant le Cénozoïque, hormis l'unique fossile précambrien attribué à un lichen, *Thuchomyces* (Hallbauer *et al.*, 1977), qui a été mis en doute (voir l'analyse de Taylor

et Taylor, 1993). Hawkworth (1988b) propose une apparition permo-triasique des lichens (190-280 Ma). Lewis (1987) et Sipman (1983) avancent des arguments indirects en ce sens. Il n'est donc pas exclu que des lichens aient colonisé le milieu terrestre dès la fin du Paléozoïque.

Cet évènement a peut-être eu un grand rôle dans l'émergence et la sortie des eaux des Ascomycètes, au sein desquels certaines formes lichénisés appartiennent aux groupes les plus archaïques (Hawksworth, 1988b). Eriksson (1981) considère par exemple que l'origine des Ascomycètes serait à rechercher parmi des algues devenues hétérotrophes et au sein de thalle gélatineux de Cyanophytes, en une association rappelant les actuelles *Collemataceae*. Nous serions tenté de reprendre cette image (hormis l'origine algale, sur laquelle nous avons déjà émis des réserves): la fréquence des lichens à Cyanophytes en zone intertidale (Lichinaceae, par exemple) pourrait dériver de ces associations primitives. Bien que non pourvues d'horloge moléculaire, les données de Gargas *et al.* (1995) suggèrent une apparition tardive de l'état lichénisé dans la radiation des Septomycètes. Une origine lichénisée des Ascomycètes semble de toute façon postérieure à la colonisation du milieu terrestre, et les lichens ne furent pas, sous leur forme actuelle, les premiers colonisateurs.

D'hypothétiques lichens primitifs furent-ils parmi les premiers colonisateurs ?

On ne peut évidemment réfuter complètement l'hypothèse que des formes lichénoïdes primitives, dont le mycobionte aurait été non septé (voire un champignon septé ancestral), aient réalisé une première colonisation dont aucun fossile indubitable ne nous serait connu. L'autotrophie pour l'azote des lichens à Cyanophytes aurait été un atout dans le milieu terrestre primitif.

Les champignons non septés sont en effet décrits dès avant le Paléozoïque. Quelle considération accorder à ces fossiles ? Les fossiles des formations marines du Gunflint (Canada, il y a environ -2000 Ma) présentent des associations d'algues et de filaments, rapportés par certains auteurs à des champignons non septés (Tyler & Barghoorn, 1954; Barghoorn & Tyler, 1965). Des confusions avec des procaryotes filamenteux ne sont pas exclues; de plus, la radiation des Eucaryotes semble un peu plus tardive (-1000 Ma, Knoll, 1992) que ces fossiles. L'horloge moléculaire de Berbee et Taylor (1993) contredit d'ailleurs l'existence de champignons précambriens. Les champignons non septés décrits en milieu marin au Précambrien tardif (Schopf & Barghoorn, 1969; Schopf, 1970; Schopf *et al.*, 1973; Tiffney & Barghoorn, 1974) et au Cambrien inférieur (dans des formations récifales: Kobluk & James, 1979), sont plus plausibles mais restent entachés des mêmes doutes (Schopf *et al.*, 1973), et ne paraissent pas mutualistes. Les champignons non septés semblent pourtant exister avant le Silurien (-395 Ma - Stubbelfield & Taylor, 1988; Pirozynski & Dalpé, 1989; Taylor, 1990, 1993b), et donc avant la sortie des eaux. Ils seraient terrestres dès le Silurien (Pratt *et al.*, 1978), mais rien ne prouve leur état mutualiste à cette époque.

Les dépôts terrestres précambriens, où existent déjà des autotrophes probablement procaryotes (Rettallack, 1981; Horodyski & Knauth, 1994), ne présentent pas d'associations évoquant ces lichens primitifs. C'est donc que les microalgues seraient sorties à l'état aposymbiotique des eaux, et que l'état lichénisé est secondaire pour elles - même s'il est ancestral pour les Ascomycètes. Il ne faut pas pour autant négliger l'im-

portance de la lichénisation dans l'extension de la colonisation du milieu terrestre par les microalgues. Si l'on ne peut rigoureusement exclure que des lichens primitifs aient existé avant le Silurien, c'est que leur fossilisation, surtout s'ils furent terrestres, a pu être difficile.

Il existe néanmoins une association actuelle, habituée des terrains pauvres colonisés par des Bryophytes, qui peut évoquer ces lichens primitifs car le mycobionte n'est pas septé. Le Zygomycète *Geosiphon pyriforme* s'associe avec des Cyanophytes du genre *Nostoc* (Mollenhauer, 1992; Mollenhauer & Kluge, 1994). Les algues vivent dans des vésicules formées par le champignon, à l'intérieur du cytoplasme; c'est donc une endosymbiose. L'association fixe le carbone (Kluge *et al.*, 1991) et l'azote (Kluge *et al.*, 1992). Il semble que le mycobionte appartienne au genre *Glomus*, d'après des études de microscopie électronique (Schüssler *et al.*, 1994) et des arguments moléculaires (M. Kluge, communication personnelle). Des tentatives d'infection mycorhiziennes avec *Geosiphon pyriforme* sont en cours (M. Kluge, communication personnelle) afin de vérifier cette observation, qui étendrait encore le spectre d'hôte des Glomales.

Eventuellement, le mycobionte primitif non septé des lichens primitifs aurait été progressivement remplacé par des Ascomycètes au cours de l'évolution, donnant naissance aux lichens actuels. Un processus semblable paraît être intervenu chez les Spermaphytes, dans l'émergence des ectomycorhizes au sein de groupes à endomycorhizes vésiculo-arbusculaires (VA, voir plus bas). Mais l'existence de tels lichens reste spéculative.

Les lichens, réussite écologique et impasse évolutive

Si les lichens ont l'autonomie nécessaire à coloniser le milieu terrestre, ils ne sont que le premier pas vers la mise en place de véritables écosystèmes terrestres. Ils sont impliqués dans un début de pédogénèse, mais ne persistent que dans des conditions physico-chimiques (température, salinité, sécheresse, vent, pentes fortes...) où la pédogénèse est limitée. Sinon, la succession végétale se poursuit et ils sont remplacés par d'autres végétaux. S'ils ont été les premiers colonisateurs, ce qui n'est pas certain, ils n'ont représentés qu'un aspect ou qu'une phase de la sortie des eaux. D'ailleurs, des communautés microbiennes terrestres, dont on ne connait pas la nature, ont probablement favorisé la sortie des eaux des Archégoniates (Rettallack, 1981; Wright, 1985).

L'adaptation des lichens à leurs conditions de vie est optimale, mais leur évolution morphologique reste limitée. Certes, les Ascomycètes lichénisants ont de grandes capacités morphogénétiques par rapport aux non-lichénisants (Honegger, 1991, 1993), ce qui illustre bien les effets modificateurs avantageux du mutualisme. Mais les thalles obtenus demeurent peu spécialisés, peu régionalisés et de relativement petite taille. Le phycobionte ne développe pas de parenchymes, et l'association ne dépasse pas les plans d'organisation thallophytiques. Ceci condamne les lichens à une stratégie uniquement poïkilohydrique, inefficace sur substrat évolué. Les Archégoniates ont en revanche un potentiel évolutif plus grand, du point de vue de la morphologie et de la spécialisation: les parenchymes ont plus de potentialités que les faux-tissus fongiques et permettent d'envisager l'homéohydrie.

Les lichens, sous leur forme actuelle, résultent d'une sortie des eaux tardive et indépendante de celle des Archégoniates, bien adaptée à des milieux dépourvus de sols.

Avant d'aborder les Archégoniates, nous allons insister sur l'existence actuelle d'association entre algues pluricellulaires (encore appelées macroalgues) et champignons.

LA COLONISATION DU MILIEU TERRESTRE PAR LES MACROALGUES: LES MYCOPHYCOBIOSES

Les mycobiontes des macroalgues

A côté des microalgues existent aussi des algues pluricellulaires (appartenant aux Rhodophytes, aux Phéophytes et aux Chlorophytes). Ces macroalgues sont aquatiques, mais certaines peuvent tolérer plus ou moins temporairement la vie émergée. Dans la zone intertidale se rencontrent actuellement des macroalgues résistant bien à l'émersion et aux conditions thermiques, hygrométriques et photoniques propres au milieu terrestre. De façon intéressante, certaines d'entre elles possèdent un mycobionte. La mycologie marine est une science en plein essor (Kohlmeyer & Kohlmeyer, 1979; Kohlmeyer & Volkmann-Kohlmeyer, 1991) et quelques ascomycètes sont considérés comme mutualistes de macroalgues.

L'association intertidale ayant donné lieu aux plus nombreuses études physiologiques est l'association d'*Ascophyllum nodosum* (Phéophyte) et de l'ascomycète *Mycosphaerella ascophylli* (Kingham & Evans, 1986). Le mycobionte ne pénètre jamais les cellules (Kohlmeyer & Kohlmeyer, 1972), peut être cultivé *in vitro* et utilise les polysaccharides et la biotine de l'algue (Fries, 1979, 1980). Celle-ci peut, quant à elle, être cultivée axéniquement *in vitro*: sa croissance n'est pas accrue par des extraits de milieu de culture du champignon (Fries, 1988). Pourtant, après la première année de croissance, tous les thalles d'*A. nodosum* observés dans la nature sont colonisés (Webber, 1967), et leur morphologie ne diffère pas de celle obtenue en conditions axéniques. De plus, les ascocarpes du champignon sont formés le plus souvent dans les réceptacles de l'hôte (voir cependant Garbary et Gautam, 1989), ce qui implique une synchronisation des cycles de développement.

Remarquablement, le même endophyte se trouve dans une autre Phéophyte, *Pelvetia canaliculata*, qui est la Phéophyte la plus élevée de la zone intertidale. D'autres macroalgues de la zone intertidale sont également associées à des ascomycètes: Phéophytes (Kohlmeyer & Kohlmeyer, 1979; Kohlmeyer & Demoulin, 1981), Chlorophytes (*Prasiola*, *Blidingia*, *Cladophora*.... - Brodo, 1976; Kohlmeyer & Kohlmeyer, 1979; Schatz, 1980) ainsi qu'une Rhodophyte (*Apophlaeae sp.* et *Mycosphaerella apophlaeae*, Hawkes, 1983; Kohlmeyer & Hawkes, 1983); de telles associations existeraient aussi en eau douce (*Lemanea* sp., Rhodophyte, avec *Phaespora lemaneae*, Hawksworth, 1987). Peu étudiées, ces associations sont apparues de façon polyphylétique puisqu'elles se rencontrent dans différents groupes d'algues. Elles font intervenir des champignons septés appartenant à des genres connus par ailleurs sur la terre ferme - donc, secondairement aquatiques. On notera également (Kohlmeyer & Volkmann-Kohlmeyer, 1991) que certains champignons marins ou intertidaux sont associés à des cyanophytes seules (genre *Lichina*, par exemple) ou à des cyanophytes et des macroalgues simultanément (*Leiophloea pelvetiae*, lichen à cyanophyte, sur *Pelvetia canaliculata*, *Pharcidia rhachiana* sur *Laminaria digitata* - Kohlmeyer & Kohlmeyer, 1979).

Mycophycobioses, morphogénèse et vie terrestre

A l'inverse des lichens vrais (morphologie du mycobionte, photobionte unicellulaire privé de multiplication sexuée), ces associations ont la morphologie du photobionte, macroalgue pluricellaire qui reste fertile. L'association paraît moins intégrée que les lichens. Il n'y a pas de reproduction asexuée conjointe ni d'équivalent connu des acides lichéniques. Cette situation, plus proche de celle des végétaux terrestres mycorhizés, conduit Kohlmeyer & Kohlmeyer (1972) à proposer le terme de mycophycobioses pour désigner cette association (tableau 2). Sa régularité, et le fait que le champignon n'entraîne aucune altération morphologique de l'algue, font postuler un mutualisme rudimentaire (Kohlmeyer & Kohlmeyer, 1979; Hawksworth, 1988b), voire un parasitisme "sans symptômes" (Lewis, 1973).

Certaines mycophycobioses montrent toutefois des altérations morphologiques de l'algue: ceci ne doit toutefois pas être considéré comme la preuve de leur nature parasitaire. Le critère de l'absence de modification morphologique ne caractérise pas le parasitisme, bien au contraire ! L'innovation morphologique est l'une des potentialités que l'association peut conférer aux partenaires (Pirozynski & Hawksworth, 1988); elle s'ajoute aux potentialités évolutives qu'offrent les pseudo-parenchymes de la macroalgue. *Turgidosculum complicatum* (=*Mastodia tessellata*), endophyte de *Prasiola borealis* et *P. tesselata* (Kohlmeyer & Kohlmeyer, 1979), induit une modification morphologique importante de cette algue (Brodo, 1976). Le thalle, habituellement monostromatique, est divisé en lobules qui se développent chacun monostromatiquement dans un plan propre; l'algue paraît alors épaisse et pseudo-parenchymateuse. L'anatomie de l'association évoque assez celle d'un lichen, mais les lichénologues ne la considèrent pas pour autant comme lichénique (Ahmadjian, 1967).

L'apport du champignon à l'algue n'est pas évident, d'autant plus que l'association ne paraît pas nécessaire *in vitro* (Fries, 1988). Le mycobionte pourrait être associé à une diminution du broutage par les herbivores (Cubit cité par Caroll, 1988), ou avoir un rôle de transfert au sein du thalle algal (Kohlmeyer & Kohlmeyer, 1979). Il est frappant de noter que la plupart des mycophycobioses sont situées dans la zone intertidale, voire très haut dans celle-ci (cas de *Pelvetia canaliculata*). Le mycobionte pourrait donc intervenir dans la tolérance à l'émersion (Kohlmeyer & Kohlmeyer, 1979; Pirozynski & Hawksworth, 1988; Kendrick, 1991). Des changements dans le métabolisme des polyols (attesté chez *P. canaliculata* en présence de *M. ascophylli* par exemple - Kingham & Evans, 1986) pourraient favoriser la résistance aux stress osmotiques induits par la dessiccation ou le gel lors de l'émersion.

Les mycophycobioses primitives: hypothèses sur la nature des partenaires.

On a pu envisager qu'une telle association, permettant à un phototrophe aquatique pseudo-parenchymateux de tolérer l'émersion ait été à l'origine de la colonisation du milieu terrestre par les Archégoniates (Jeffrey, 1962). Si les Archégoniates dérivent d'une mycophycobiose, peut-on en préciser les partenaires ?

Les études, morphologiques, biochimiques et moléculaires (Frederick *et al.*, 1973; Mishler & Churchill, 1985; Raven, 1987; Taylor, 1988; Manhart & Palmer, 1990) suggèrent un ancêtre des Archégoniates parmi les Chlorophytes, proche des Charophycées, notamment des Charales. Ces algues possèdent des oogones protégés,

qui peuvent être à l'origine de l'archégone des Archégoniates. Par ailleurs, elles possèdent l'équipement enzymatique permettant la désamination des acides aminés aromatiques (phénylalanine ammonia-lyase). La double liaison formée lors de cette élimination permet d'absorber plus efficacement les ultraviolets néfastes (voie des phytoalexines, notamment).

On peut donc, en simplifiant, assimiler l'origine des végétaux terrestres à la sortie des eaux d'une (monophylétisme) ou plusieurs (paraphylétisme) Charophycée(s). Selon Graham *et al.* (1991), la sortie des eaux des Archégoniates serait plutôt monophylétique; ceci n'exclue bien sûr pas que de nombreuses tentatives, indépendantes phylogénétiquement mais sans descendance, aient pu avoir lieu à l'origine. Les Chlorophytes pluricellulaires (Conway Morris & Robinson, 1988; Knoll, 1992; Taylor & Taylor, 1993) sont différenciées dès le début du Paléozoïque, c'est-à-dire suffisamment tôt pour permettre la sortie des eaux des Archégoniates au Silurien supérieur. A cette époque, les Charophycées existent (Kidston & Lang, 1921; Edwards & Lyon, 1983).

Par ailleurs les mycobiontes associés aux phototrophes actuels sont non septés (Glomales) dans près de 80% des cas. Un mycobionte raisonnable lors de la sortie des eaux serait donc non septé. Or, comme nous l'avons déjà évoqué, les champignons non septés existent dès avant le Silurien. Sur la base d'hyphes, de vésicules ou de chlamydospores, d'autres auteurs retrouvent d'ailleurs le genre *Glomus* au Paléozoïque (Taylor, 1993a), ce qui est cohérent avec l'horloge moléculaire de Berbee et Taylor, 1993. Dans une analyse critique poussée, Pirozynski et Dalpé (1989) acceptent les fossiles décrits à partir du Dévonien (-395 Ma). D'autres observations, plus anciennes, seraient suspectes de contamination par du matériel moderne lors de l'extraction. Ancêtres potentiels des Archégoniates et des Glomales ont donc pu interagir au Silurien en une structure proche des mycophycobioses.

Les mycophycobioses actuelles évoquent de possibles associations primitives

Quel lien y a-t-il entre ces mycophycobioses supposées et les mycophycobioses actuelles ? Les mycophycobioses actuelles ne présentent pas le mycobionte non septé postulé pour les associations primitives. Pourtant, comme l'observe Pirozynski (1981), les *Endogonaceae* sont présents en milieu marin, où ils s'associent notamment avec des bivalves (*Anomia simplex* par exemple). Il faut donc supposer que ces associations primitives, au fort potentiel évolutif, aient évolué sans laisser aucune descendance directe, ou que d'éventuels descendants non modifiés de celles-ci aient été remplacés dans leurs niches originelles par des associations à ascomycètes, formées plus tardivement (indépendamment ou par substitution du partenaire non septé par un ascomycète). D'ailleurs, un évènement d'extinction en masse aussi violent que la crise permo-triasique, qui marque la fin du Paléozoïque, a probablement fait disparaître les formes de transition vers le milieu terrestre: 90% de la faune sessile du littoral fut décimée par cette crise, qui entraina de grandes régressions marines (Erwin, 1994).

Le mycobionte des mycophycobioses n'a pas le rôle nutritionnel postulé pour la conquête du milieu terrestre. Mais, même si l'on se refuse à considérer les mycophycobioses comme mutualistes (le genre *Mycosphaerella* comporte par ailleurs des espèces terrestres phytoparasites), elles montrent que l'association stable d'un champi-

gnon et d'une macroalgue est possible, ouvrant la voie à une évolution commune. Le mycobionte pourra alors acquérir un rôle dans la nutrition du photobionte. Cette évolution, et la conquête des milieux émergés, sont certainement limitées pour les mycophycobioses actuelles par l'équipement pigmentaire du photobionte (photosynthèse et photoprotection). Tout au moins les mycophycobioses actuelles évoquent-elles ce qu'on pu être ces associations primitives.

L'étude des fossiles des premiers végétaux terrestres montre-t-elle une origine mutualiste des Archégoniates, et permet-elle de retrouver des mycophycobioses fossiles ?

LA COLONISATION DU MILIEU TERRESTRE PAR LES PREMIERS VEGETAUX TERRESTRES PLURICELLULAIRES

La sortie des eaux: un tableau paléontologique flou

Les premiers végétaux terrestres pluricellulaires connus par des fossiles apparaissent au Silurien (vers -400 Ma, Pratt *et al.*, 1978), voire au plus tôt à l'Ordovicien supérieur, si l'on en croit les fragments de cuticules et spores datés de -470 Ma (Gray, 1985; Taylor & Taylor, 1993). Ces fossiles sont difficilement interprétables, car ils ne peuvent être rattachés sans controverse à des groupes actuels. L'exemple du genre *Protosalvinia*, végétal non vasculaire du Dévonien (Gray & Boucaut, 1979), attribué selon les auteurs aux Ptéridophytes, aux Bryophytes, aux Rhodophytes ou aux Phéophytes, est révélateur. Par leur morphologie, ces premiers végétaux terrestres rappellent des algues ou des Hépatophytes (Gray, 1985; Taylor, 1988; Edwards *et al.*, 1995), sans qu'une affiliation aux Hépatophytes modernes soit plausible (Krassilov & Schuster, 1983): ces tentatives n'ont pas de descendance actuelle évidente. Plusieurs tentatives de sortie des eaux, indépendantes phylogénétiquement, pourraient avoir eu lieu: de même, actuellement, lichens et mycophycobioses font intervenir plusieurs groupes d'algues et sont donc polyphylétiques du point de vue du phycobionte. Il est donc difficile d'avoir une interprétation consensuelle des données paléontologiques.

Certains fossiles de végétaux primitifs font intervenir des structures évoquant des hyphes, mais cette interprétation est souvent discutable. En effet, si les parois fongiques peuvent être bien préservées, des confusions sont possibles avec des structures filamenteuses non fongiques ou des artéfacts de fossilisation: c'est le cas de certaines structures endocellulaires interprétées comme des endomycorhizes (Cridland, 1962). De plus, il est difficile de conclure sur la nature des échanges physiologiques, mutualistes, parasitistes, ou même saprophytiques *post-mortem*, qui s'opéraient dans les structures observées. L'intégrité des tissus de l'hôte, attestant la biotrophie, est d'une observation délicate.

La radiation des mycobiontes non septés actuels serait contemporaine de la sortie des eaux

Outre l'ancienneté des fossiles rapportés aux Glomales évoquée plus haut, plusieurs indices laissent à penser que le mutualisme de type endomycorhizien est ancien. Comme nous le verrons plus loin, de nombreux végétaux terrestres sont actuellement

associés à des Glomales, alors qu'ils appartiennent à des familles éloignées les unes des autres; la répartition géographique universelle des champignons endomycorhiziens suggère que ces associations se sont mise en place avant la fragmentation de la Pangée (vers -150 Ma - Pirozynski, 1981). L'ancienneté de ce mutualisme est également suggérée par la biotrophie obligatoire. La culture *in vitro* est en effet actuellement impossible et la sexualité des Glomales est très réduite, voire absente. Les Glomales constituent donc probablement un groupe de "fossiles vivants", protégés dans la niche écologique très stable que représente l'endophytisme.

Cette ancienneté serait contemporaine de l'apparition des végétaux terrestres. Un autre argument en ce sens a été récemment fourni par la comparaison des gènes ribosomaux des Glomales, et de la datation des divergences entre les principales familles à l'aide d'une horloge moléculaire (Simon *et al.*, 1993). Si les *Acaulosporaceae* et les *Gigasporaceae* divergent des *Glomaceae* à la fin du Paléozoïque, l'ensemble des Glomales [redacted] sépare des zygomycètes non endomycorhiziens entre -460 et -355 Ma, c'est-à-dire, à l'époque de la sortie des eaux (Silurien): nous évoquerons plus loin les travaux paléontologiques de Remy *et al.* (1994) qui soutiennent cette assertion. Ce résultat est cohérent avec ceux de l'horloge de Berbee et Taylor (1993), qui datent la divergence entre Glomales et Septomycètes à -490 Ma environ (Ordovicien). Ceci indiquerait une radiation conjointe des végétaux terrestres et de leurs mycobiontes actuels. Plus encore, c'est peut-être de cette association qu'auraient émergé les Septomycètes. Citons Berbee & Taylor (1993): "il n'est pas impossible que la radiation des champignons vrais trouve son origine dans des groupes de champignons d'eaux douces associés à des algues vertes, voisins des chytridiens". Ces données sont à prendre avec précaution: l'étalonnement de l'horloge moléculaire est toujours délicat, et rien ne permet d'affirmer la nature des relations qui unissaient les ancêtres des Glomales aux premiers végétaux terrestres. Taylor et Taylor (1993) discutent d'ailleurs le mutualisme. Néanmoins, la radiation conjointe est cohérente avec notre hypothèse. Les données paléontologiques ajoutent-elles des arguments à ces observations ? Nous analyserons successivement le cas des macrophytes fossiles non vasculaires, puis vasculaires.

Les premiers macrophytes terrestres [redacted] vasculaires ne montrent aucun mutualisme indiscutable

Les Nématophytes, structures thalloïdes terrestres du Silurien, d'affinité systématique discutée, sont surtout connues par des fragments. Ces végétaux ont pu être interprétés comme des structures mixtes, le partenaire fongique y étant représenté par des structures allongées et tubulaires (Pirozynski & Malloch, 1975). Une nature mutualiste pourrait être suggérée pour les fossiles de Nématophytes, dont *Prototaxites* (=*Nematophycus*), végétal non vasculaire de la flore de Rhynie, en raison de la présence en leur sein de structures filamenteuses dotées de curieux *septa* (Schmid, 1976; Stubbelfield & Taylor, 1988). Burgess et Edwards (1988) notent dans leur description du genre voisin *Nematasketum* "la ressemblance superficielle de (ces) systèmes filamenteux apparemment fusionnés avec les agrégations hautement organisées d'hyphes fongiques dans les lichens et de filaments dans les algues brunes". Des structures filamenteuses isolées sont souvent observées, semblables aux structures médullaires des Nématophytes, au Silurien (Taylor, 1988; Taylor & Taylor, 1993).

De telles structures ne nous paraissent pas nécessairement caractéristiques de champignons, car des cellules semblables à des hyphes sont connues chez des macroalgues actuelles: Rhodophytes, Chlorophytes (Codiales), Phéophytes (Fucales, Laminariales). De telles analogies, invoquées pour appuyer le lien évolutif entre algues et champignons (Kohlmeyer, 1975; Chadefaud, 1972; Demoulin, 1974, 1985), peuvent aussi résulter de convergences évolutives. L'existence de mycophycobioses parmi les premiers végétaux terrestres [redacted] nous paraît donc pas prouvée de façon indiscutable. Au Silurien supérieur, *Parka*, algue verte proche des actuels *Coleochaete* (Taylor & Taylor, 1993), est une forme intermédiaire probable dans la sortie des eaux, mais ne montre aucun mycobionte. Pourtant, des interactions de type parasitaire sont connues à cette époque sur des fossiles de Charophycées (Plasmodiophoromycète sur *Paleonitella* - Taylor *et al.*, 1992): donc la fossilisation n'est pas limitante.

Les végétaux vasculaires primitifs fossiles contiennent des mycobiontes probables

Les végétaux vasculaires (ou Trachéophytes) primitifs semblent s'être développés dès le Silurien (Boureau *et al.*, 1978), à proximité de la limite eau/terre ferme, comme les bords des eaux douces ou saumâtres. Ces Trachéophytes primitifs ont été apparentés à des Ptéridophytes actuels (Boureau *et al.*, 1978; Edwards & Fanning, 1985). L'originalité de leur appareil végétatif est de comporter des cellules différenciées pour la conduction de l'eau et des solutés, ce qui favorise la régionalisation des échanges avec le milieu et autorise la différenciation de parties aérienne et souterraines (Raven, 1977). Certains auteurs conjecturent que cette évolution pourrait avoir été également favorisée par l'influence du champignon sur la morphogénèse du végétal (Jeffrey, 1962; Remy *et al.*, 1992), notamment sur l'apparition de parenchymes massifs et de la vascularisation. Lewis (1991) propose notamment qu'en stimulant le métabolisme de la phénylalanine ammonia-lyase, les champignons aient pu favoriser l'apparition de la lignine, autre caractéristique des végétaux vasculaires (Raven, 1977).

Les premiers Trachéophytes présentent-ils des preuves indiscutables d'association avec des partenaires fongiques postulés plus haut ? Le problème est de cerner les premiers végétaux vasculaires. *Cooksonia* est considéré comme le plus ancien trachéophyte, alors que la compression du matériel fossile interdit toute étude anatomique d'éventuels faisceaux conducteurs (Taylor, 1988). Sur des restes exceptionellement conservés, Edwards *et al.* (1986) n'en trouvent pas. D'autre part, aucun endophyte n'a été décrit dans *Cooksonia* - Pirozynski (1981) estime pourtant que ce n'est qu'une question de temps. Loin de présenter une morphologie caractéristique de trachéophyte, *Orestovia*, organisme thalloïde du Dévonien, serait vasculaire (Krassilov, 1981). Ce végétal, associé à un champignon possiblement ascomycète, pourrait représenter une association mutualiste colonisatrice et mériterait plus d'attention. Krassilov estime néanmoins que la relation est de type parasitaire.

Au-delà de ces spéculations, il est frappant de remarquer que l'un des plus anciens témoignages de végétation vasculaire montre des associations mutualistes. Il s'agit de la flore silicifiée de Rhynie, datant du Dévonien inférieur, actuellement interprétée comme un écosystème semi-lacustre. Une cinquantaine d'espèces fongiques y a été reconnues par Kidston et Lang (1921). Ces auteurs ne décrivent pas de mutualistes, tout en n'excluant pas qu'il y en ait parmi ces espèces. Pourtant, *Palaeomyces aste-*

roxyli, dans les rhizomes d'*Asteroxylon*, est souvent cité comme exemple d'association de type VA (Stubblefield & Taylor, 1988 avec référence à Kidston & Lang, 1921 !). Dans une étude des champignons de la flore de Rhynie, Boullard et Lemoigne (1971) décrivent une association mutualiste sur *Rhynia gwynne-vaughanii* et *Rhynia major*, deux Archégoniates primitifs (Lemoigne, 1968). L'association est régulière, n'entraîne pas de nécrose et épargne les axes dressés, la stèle, les apex et les gamétanges. Ces caractères évoquent ceux observés chez les Ptéridophytes mutualistes actuelles et poussent ces auteurs à conclure à une symbiose mutualiste. La présence du même endophyte dans ces deux végétaux soutient l'hypothèse de Lemoigne (1968) selon laquelle *Rhynia gwynne-vaughanii* est le gamétophyte de *Rhynia major*. Cette analyse des *Rhynia* est partiellement remise en cause par certains auteurs. Edwards (1986) observe des sporanges sur *Rhynia gwynne-vaughanii* et interprête l'ornementation réticulée des trachéides comme un artefact de dégradation bactérienne; ces "trachéides" seraient en fait équivalents à des hydroïdes de mousses. Ces observations justifieraient le reclassement de *Rhynia gwynne-vaughanii* au sein d'un genre nouveau, *Aglaophyton*, proche d'un stock ancestral commun aux Bryophytes et aux Trachéophytes.

Une telle approche implique d'une part que le mycobionte commun à *Rhynia major* et *Aglaophyton* ait été peu spécifique et répandu dans la flore d'alors, comme les champignons endomycorhiziens actuels, d'autre part, que la présence d'un mycobionte soit bien un caractère ancestral au sein des Archégoniates. A l'encontre de Boullard et Lemoigne, Remy *et al.* (1994) observent de très beaux arbuscules dans la zone corticale, dotée de cellules à parois minces, d'*Aglaophyton*. Ces arbuscules prouvent à la fois l'ancienneté des associations de type VA et confirment l'ancienneté des Glomales. La description d'arbuscules sur *Rhynia major* est probablement une question de temps (alternativement, on notera l'absence d'arbuscules, sur des associations actuelles à partenaire non septé comme celles de *Gentianaceae* (McGee, 1985) ou surtout celles de *Psilotum nudum* sur lesquelles nous reviendrons). Remy *et al.* (1994) concluent de ces observations que "les champignons saprophytes, parasites et mutualistes (souligné par nous) existaient bien au Dévonien" et que "de telles interactions ont accompagné le développement de la flore terrestre".

Le mutualisme peut expliquer comment ces organismes, seulement pourvus de rhizoïdes, ont pu absorber efficacement les éléments minéraux du milieu (Lewis, 1991). A partir du Dévono-carbonifère, des endophytes de type endomycorhizien sont couramment décrits dans les restes des Trachéophytes (Cridland, 1962; Wagner & Taylor, 1981, 1982; Stubblefield *et al.*, 1985 notamment - pour revue, voir Pirozynski, 1976; Stubbelfield & Taylor, 1988; Taylor, 1990, 1993b).

En conclusion, l'étude des fossiles ne permet pas d'affirmer l'existence systématique d'associations mutualistes parmi les premiers végétaux vasculaires, mais l'absence de fossiles convaincants n'est guère étonnante, compte-tenu des difficultés d'interprétation. En revanche, l'importance du mutualisme paraît confirmée dès le Dévonien inférieur. L'analyse des Archégoniates actuels va nous permettre de cerner davantage l'évolution et le rôle du mutualisme dans la sortie des eaux.

LA COLONISATION DU MILIEU TERRESTRE PAR LES ARCHÉGONIATES INFÉRIEURS ACTUELS

Les Archégoniates inférieurs sont les Archégoniates qui ne forment ni fleurs, ni graines. On peut les subdiviser en deux groupes:

- les Bryophytes, Hépatophytes et Anthocérotophytes forment un groupe (*Atrachaeta* de certains auteurs) certainement polyphylétique (Crandall-Stotler, 1986), non vasculaire et où l'haplophase reste majeure (gamétophyte développé, sporophyte porté par le gamétophyte);
- les Ptéridophytes comprennent de nombreux groupes caractérisés par leur état vasculaire et la dominance de la diplophase (sporophyte développé).

La diversité du mutualisme chez les Anthocérotophytes et les Hépatophytes

Les Anthocérotophytes et les Hépatophytes occupent un autre milieu offert à la colonisation par les végétaux aquatiques: les bords des eaux douces. Certaines Anthocérotophytes et certaines Hépatophytes forment des associations avec des champignons, dont les structures et la régularité dans les espèces concernées (Boullard, 1988), laissent penser à un mutualisme, même si aucune étude physiologique ne permet de l'affirmer. L'infection est limitée à certaines parties de l'hôte et épargne les méristèmes, les gamétanges, les sporophytes et les propagules végétatives. Seul le gamétophyte est mutualiste: on parle de mycothalle pour désigner le thalle mixte formé, dont l'infestation systémique n'est pas sans évoquer les mycophycobioses. Mais, à l'échelle cellulaire, les structures sont bien différentes et évoquent plutôt les associations mycorhiziennes (tableau 3).

Le gamétophyte de *Phaeoceros laevis* (Anthocérotophyte) est ainsi associé avec un mycobionte non septé, présentant des arbuscules (Ligrone, 1988). Chez les Hépatophytes, la situation est plus complexe (Pocock & Duckett, 1985a, c; Boullard, 1988) et l'on distingue principalement trois types d'association.

Certaines Jungermanniales (*Jungermanniineae* et *Geocalycineae*) et quelques Metzgeriales (*Aneuraceae*) abritent régulièrement des basidiomycètes dicaryotiques, sans anses d'anastomoses (Pocock & Duckett, 1984), dont le parenthésome imperforé indique que ce sont probablement des Hétérobasidimycètes (Ligrone *et al.*, 1993). On observe des dérives vers des formes non chlorophylliennes mycotrophes[1], dépendant probablement du mycobionte pour leur alimentation carbonée: c'est le cas de *Cryptothallus mirabilis*, dont l'organisme souterrain est dépourvu de pigments chlorophylliens (Pocock & Duckett, 1984). L'ultrastructure de ces associations révèle des similitudes avec les endophytes d'*Orchidaceae*: on observe notamment des phases de digestion du mycobionte (Ligrone *et al.*, 1993): l'existence de formes mycotrophes est un autre point commun.

(1) Nous désignons par "mycotrophie" la situation physiologique où le végétal est sous la dépendance trophique du champignon pour son alimentation carbonée. Ceci n'exclut pas des échanges, vitaminiques en particulier, du végétal vers le champignon. Le végétal n'est alors plus phototrophe, mais mycotrophe.

TABLEAU 3: Les principaux types morphologiques de mycorhizes et leurs caractéristiques résumées.

TYPE	"vésiculo-arbusculaire"	"ectomycorhizien"	"ectendomycorhizien" (1)	"à pelotons" (2)
PHOTOBIONTE	Plus de 80% des Spermaphytes et la plupart des Ptéridophytes	Spermaphytes ligneuses (très rares Ptéridophytes)	Spermaphytes	Spermaphytes et certaines Ptéridophytes
MYCOBIONTES	non septés, biotrophes stricts "Glomales" 200 espèces	septés, voisins de genres saprophytes Asco- et Basidio-mycètes 5000 espèces	septés Asco- et Basidio-mycètes quelques espèces	septés, voisins de genres parasites Asco- et Basidio-mycètes environ 10 espèces
STRUCTURES FONGIQUES (% de l'organe mixte formé)	vésicules seulement ou vésicules et arbuscules intracellulaires (10%)	manteau fongique autour de la racine et réseau de Hartig cortical, strictement extracellulaire (40%)	manteau d'épaisseur variable, réseau de Hartig et structures intracellulaires (pelotons, suçoirs...) (variable)	hyphes et pelotons intracellulaires (40%)
ANCIENNETE	Silurien	Crétacé (ou plus tardif ?)		
RESSOURCES EXPLOITEES PAR LE MYCOBIONTE	phosphore inorganique >> sols bien minéralisés	phosphore organique ou non azote organique ou non >> sols moyennement minéralisés	mal connu et probablement variables selon les types - parfois, le mycobionte est par ailleurs symbiote d'un autre végétal	phosphore et azote organiques >> sols mal minéralisés
CAS DE MYCOTROPHIE	+	-	+	+
ASSOCIATIONS SEMBLABLES CHEZ D'AUTRES PHOTOTROPHES	Marchantiales Metzgeriales Anthocérotophytes	Mycophycobioses actuelles Lichens Endophytes de Monocotylédones	-	Jungermaniales Metzgeriales

(1) Les mycorhizes arbutoïdes et monotropoïdes des Ericales sont comprises dans ce type. (2) Mycorhizes des *Orchidaceae* et mycorhizes éricoïdes des Ericales.

Source : MNHN, Paris

Certaines Marchantiales et certaines Metzgeriales (*Fossombroniaceae*) s'associent avec un mycobionte non septé (Strullu *et al.*, 1981) produisant des arbuscules intracellulaires, voire des vésicules (Ligrone & Lopes, 1989), comme dans le cas des endomycorhizes vésiculo-arbusculaires, à tel point que le mycobionte pourrait être un Glomale (Strullu *et al.*, 1981; Boullard, 1988). Toutefois, des souches de *Pythium* (Oomycète) auraient été isolées à partir de thalles infectés (Carré & Harrisson, 1961). Ce type d'association semble sporadique au sein même des espèces concernées (des thalles aposymbiotiques peuvent être trouvés, Duckett *et al.*, 1991).

Enfin, dans certaines espèces de deux sous-ordres de Jungermanniales (*Lepidoziineae* et *Cephaloziineae*), on observe régulièrement des rhizoïdes infectés par des hyphes qui se prolongent dans le substrat (Pocock & Duckett, 1985b). L'apex de ces rhizoïdes est alors renflé. L'ultrastructure du mycobionte révèle qu'il s'agit d'ascomycètes (Duckett & Renzaglia, 1988; Duckett *et al.*, 1989). Parfois, ces Hépatophytes émettent dans le substrat des axes flagelliformes riches en rhizoïdes infectés, aux feuilles régressées ou absentes (Duckett & Clymo, 1988; Duckett *et al.*, 1991): de tels organes explorent le sol sur plusieurs dizaines de centimètres et pourraient remplir la fonction de racine (Duckett *et al.*, 1989). Ces associations, qui se rencontrent dans des milieux riches en matière organique, rappellent les mycorhizes éricoïdes (Duckett *et al.*, 1991; Duckett & Read, 1991) dont ils partageraient les mycobiontes (Duckett & Read, 1995). Pocock et Duckett (1985b) notent des cas possibles de mycotrophie: des espèces du genre *Kurzia*, pourvues de rhizoïdes infectés, vivent à l'ombre de *Calluna* et ont une couleur pâle, suggérant une faible teneur en chlorophylle.

Origines du mutualisme chez les Hépatophytes

Quelle est l'ancienneté de ces associations, et plus particulièrement de celles impliquant un partenaire non septé ? Aucun fossile ne répond à cette question, mais les associations impliquant des Ascomycètes ou des Basidiomycètes pourraient être tardives, comme nous le verrons pour les mycorhizes impliquant ces mycobiontes. Les associations seraient apparues après la divergence des principaux ordres d'Hépatophytes (Marchantiales, Metzgeriales et Jungermanniales), et de façon polyphylétique, attestant d'une prédisposition de ce groupe aux interactions avec les champignons (Duckett & Ligrone, 1985; Duckett *et al.*, 1991).

Il est également difficile de se prononcer quant à l'ancienneté de ces phototrophes. Krassilov et Schuster (1983) supposent que "leur capacité à se diversifier - voire, à coloniser les continents - a été favorisée par l'évolution préalable d'un couvert de grandes plantes vasculaires". Les fossiles connus, malgré la fossilisation probablement médiocre de ces organismes, indiquent au plus tôt une origine tardisilurienne pour les Hépatophytes et mésozoïque pour les Anthocérotophytes, et infirmeraient l'hypothèse d'un rôle dans la colonisation initiale du milieu terrestre (Schuster, 1981; Krassilov & Schuster, 1983; Taylor & Taylor, 1993).

Ces associations impliquent des modifications du thalle (comme par exemple le renflement de l'apex des rhizoïdes colonisés - Duckett *et al.*, 1991, Boullard, 1988), illustrant les innovations morphologiques liées au mutualisme. Ces associations semblent par ailleurs liées à un relatif affranchissement de l'eau: elles sont absentes dans des conditions de forte humidité (Boullard, 1988). La présence chez les Hépatophytes

de cuticule et de structures évoquant des stomates, quoique moins finement régulées, indiquent une tendance à l'homéohydrie. La présence du mycobionte (parfois au sein d'axes flagelliformes rappelant des racines) s'inscrit dans cette tendance. Mais ces Bryophytes restent inféodées à des milieux peu hostiles et n'ont pas donné lieu à une grande diversification évolutive: la dominance de l'haplophase a probablement limité les potentialités évolutives de ces groupes.

Les Bryophytes (*stricto sensu*) ont adopté une stratégie poïkilohydrique, [redacted] mutualiste

Les Bryophytes présentent de nombreux traits archaïques ou peu évolués dont certains les rapprochent des Charophycées: structure de l'archégone et modalités de fécondation, morphologie de l'appareil végétatif, cycle à haplophase dominante,... (Mishler & Churchill, 1985, Graham *et al.*, 1991). Elles réussissent néanmoins à coloniser le milieu terrestre avec plus ou moins de succès. Les premiers fossiles connus datent du dévono-carbonifère (Krassilov & Schuster, 1983; Taylor & Taylor, 1993), c'est-à-dire tard pour participer à la colonisation initiale du milieu terrestre.

Aucun mycobionte n'a été décrit dans ce groupe (Jeffrey, 1962; Parke & Linderman, 1980; Pocock & Duckett, 1985c), ce qui constitue un caractère régressif si l'on considère que les premiers Archégoniates étaient pourvus de mycobiontes (*Aglaophyton*, par exemple). Tout au plus, une colonisation par des Glomales, sans formation d'arbuscules, est observable à proximité d'autres végétaux endomycorhizés (Parke & Linderman, 1980). Cependant, les mousses semblent avoir été capables de quitter rapidement les milieux situés à l'interface entre l'eau et les terres émergées et de coloniser des milieux hostiles, où elles concurrencent les lichens. Elles ont adopté une stratégie de tolérance aux privations hydriques et donc minérales: la poïkilohydrie, particulièrement efficace notamment sur les substrats à peine modifiés par les associations lichéniques. La croissance continue d'un axe qui se décompose lentement après la mort des cellules permet le piégeage des débris résultant de l'altération du substrat, des cendres volcaniques et des apports éoliens. Ceux-ci s'accumulent avec la matière organique issue des mousses elles-mêmes: c'est la stratégie du coussinet, bien adaptée à la formation de sols primitifs et à l'installation d'une microflore diversifiée.

L'association avec des champignons n'est donc pas une condition nécessaire à la vie en milieu terrestre des Archégoniates, mais plutôt une condition nécessaire à une stratégie minimisant les privations hydriques (ou homéohydrie) au sein de ce groupe. Les Bryophytes évoluèrent sans partenaire fongique (Jeffrey, 1962), en adoptant une stratégie poïkilohydrique certes efficace, mais lourde d'implications. Diverses raisons ont en effet concouru à limiter l'apparition de structures spécialisées dans ce groupe: pour maximiser l'absorption hydrique et minérale en période de végétation, toute la surface de l'organisme effectue cette fonction; la dessiccation à laquelle l'organisme est soumis [redacted] limité l'apparition de structures délicates; de surcroît, l'haplophase dominante ne semble guère propice à la complexification. Aussi les Bryophytes constituent-elles une relative impasse évolutive, et leur place reste-t-elle marginale, comme celle des Anthocérotophytes et des Hépatophytes, dans la plupart des écosystèmes terrestres.

Cependant, les autres archégoniates, dotés d'un mycobionte, ont une stratégie homéohydrique vraie grâce à l'apparition de systèmes conducteurs (Raven, 1977).

L'homéohydrie favorise l'apparition d'organes et d'une régionalisation des échanges avec le milieu (racines/feuilles). C'est cette stratégie, et le rôle qu'y joue le mycobionte, que nous allons analyser maintenant.

Les Ptéridophytes sont mutualistes depuis leur émergence

Les Ptéridophytes sont associés à des mycobiontes, septés ou, le plus souvent, non septés, qui se développent dans les parties non chlorophylliennes. Le mycobionte s'associe aux gamétophytes, pour lesquels le terme de mycothalle peut être conservé, et/ou aux sporophytes, où le mycobionte envahit les racines, formant d'authentiques mycorhizes, et parfois le rhizome ("mycorhizome"). Selon Harley et Harley (1987), 70% des Ptéridophytes de la flore anglaise sont mutualistes. Le travail considérable de Boullard (1979), appuyé par celui de Berch et Kendrick (1982), a bien montré la nature mutualiste de ces Trachéophytes. Il n'a guère été complété depuis que par les apports de la microscopie électronique.

Chez les Lycophytes, les Lycopodiales abritent des mycobiontes septés ou non septés. Des vésicules (Schmid & Oberwinckler, 1993) et parfois des arbuscules intracellulaires (voir notamment Duckett et Ligrone, 1992) ont été décrits dans cet ordre, évoquant des endomycorrhizes VA. L'association est régulière pour les gamétophytes, souvent non-chlorophylliens et souterrains, qui dépendent probablement du mycobionte pour leur alimentation carbonée; elle est peu fréquente dans les sporophytes. Les Sélaginellales, à l'inverse, possèdent souvent des mycobiontes septés ou non (Boullard, 1979) dans le sporophyte, mais jamais dans le gamétophyte: ici encore, des vésicules et des arbuscules peuvent être observées. Seules les Isoetales, généralement aquatiques, paraissent dépourvues de telles associations. Les fossiles carbonifères de ce groupe montrent déjà de nombreuses associations (Boullard, 1979), souvent discutées toutefois (Cridland, 1962).

Au sein des Psilophytes actuelles, des mycobiontes ont été décrits dans les gamétophytes et certaines parties des sporophytes, chez *Tmesipteris* (Holloway, 1917) et *Psilotum nudum*, où un mycobionte non septé, formant des vésicules a été décrit (Bierhorst, 1953; Peterson *et al.*, 1981), ainsi qu'un mycobionte septé (Bierhorst, 1953). *Psilotum*, aux caractères primitifs (pas de feuilles ni de racines, embryon exoscopique), rappelle assez la morphologie des *Rhynia* de la flore de Rhynie et constituerait selon certains auteurs un "fossile vivant" (Lemoigne, 1968): l'existence, dans les deux cas, d'endophytes non septés appuie cette similitude. Le mycobionte non septé de *Psilotum* ne forme toutefois pas d'arbuscules, ce qui évoque le cas des Lycophytes.

Les Sphénophytes forment des associations réputées rares, peu étendues et facultatives au niveau du sporophyte (Boullard, 1979). Koske *et al.* (1985) signalent néanmoins de fréquents mycobiontes non septés formant des vésicules et des arbuscules sur le matériel qu'ils étudient. Les associations semblent, selon ces auteurs, se former surtout dans les milieux secs.

Les Filicophytes possèdent également des mycobiontes. Ces associations impliquent un partenaire non septé, formant vésicules et arbuscules, ou parfois septé voire pourvu de boucles (Boullard, 1979). Ces associations sont constantes dans les gamétophytes et les sporophytes des Eusporangiées. Diverses situations existent en revanche chez les Leptosporangiées. Ainsi, les Hydroptéridales n'ont pas de mycobionte, tandis

qu'au sein des Filicales, les associations peuvent être régulières (gamétophytes des *Schizaeaceae*, sporophytes des *Gleicheniaceae*), fréquentes (*Pteridaceae*) ou lâches et facultatives (*Aspleniaceae, Polypodiaceae*,...). De rares ectomycorhizes ont été décrites chez des Filicophytes (*Dryopteris filix-mas*, Harley & Harley, 1987), notamment habitant des forêts riches en ectomycorhizes (Cooper, 1976).

L'identité des partenaires des Ptéridophytes est mal établie. Des Glomales sont probablement impliquées, ainsi que certains Oomycètes: des souches de *Pythium* ont en effet été isolées à partir de mycorhizomes de leptosporangiées (Hepden, 1960). Quant aux partenaires septés, leur identification reste à préciser. Dans le tableau 3, nous proposons de rapprocher certaines de ces associations des endomycorhizes à Septomycètes. Le rôle de ces mycobiontes a également été rarement étudié, mais leur effet bénéfique a pu être montré en culture *in vitro*, par comparaison avec des témoins aposymbiotiques (Freedberg, 1962). Ils seraient notamment impliqués dans l'apport de phosphore au photobionte (Cooper, 1976, 1977).

Tendances du mutualisme chez les Ptéridophytes

Possédant un cycle surtout diplophasique, qui optimise l'exploitation du brassage génétique issu de la la fécondation, les Ptéridophytes vont envahir les écosystèmes terrestres, avant de laisser, à la fin du Mésozoïque, la place aux Spermaphytes. Chez les Ptéridophytes, Boullard (1979) propose des tendances évolutives du mutualisme. L'évolution du gamétophyte conduit à une réduction de l'haplophase et la perte du mutualisme s'opère parallèlement à la perte de taille et la diminution de la durée de vie du gamétophyte. L'affranchissement du sporophyte est plus tardif dans l'évolution des Ptéridophytes, et s'opère alors qu'apparaissent feuilles et racines qui assureront son indépendance trophique à l'organisme.

Notons d'abord que les Ptéridophytes aquatiques (*Isoetaceae*, Hydroptéridales) sont dépourvues de mycobionte, ce qui est cohérent avec l'hypothèse d'un rôle du mycobionte dans l'homéohydrie; l'investissement en photosynthétats exigé par le mycobionte ne se justifie pas lorsque l'eau et les solutés sont abondants. De plus "qu'il s'agisse de rhizomes, de racines ou même de gamétophytes, une indiscutable carnosité accompagne l'endosymbiose" (Boullard, 1979). Cette morphologie, particulièrement charnue, semble bien liée à la présence du champignon, puisqu'elle disparaît en l'absence du mycobionte dans le cas de gamétophytes de *Lycopodium* cultivés *in vitro* (Freeberg, 1962; Freeberg & Wetmore, 1957). Cette observation vient conforter, comme chez les Hépatophytes, le rôle de "stimulateur" de la morphogénèse que nous avons attribué au mycobionte pour les premiers végétaux terrestres.

Enfin, de nombreux gamétophytes non chlorophylliens et souterrains, appartenant à des groupes divers, semblent dépendre du mycobionte pour leur alimentation carbonée. Cette tendance à la mycotrophie, déjà observée sur des Hépatophytes pourvues de mycobiontes septés, s'exprime chez les Lycophytes (*Lycopodiaceae* et *Urostachyaceae*), les Psilophytes (*Tmesipteris*, *Psilotum*) et les Filicophytes (Eusporangiées: *Ophioglossaceae*; Leptosporangiées: *Schizaeaceae*) (Boullard, 1979; Hadley, 1986). Clairement, cette stratégie ne convient pas dans le cas de milieux entièrement lithiques. Plusieurs explications peuvent être avancées. Une telle dépendance trophique du gamétophyte a pu se développer au cours de l'évolution régressive du gamétophyte, notam-

ment favorisée par l'apparition d'écosystèmes dotés de sols riches en matière organique. Cette stratégie peut aussi être primitive, les gamétophytes trouvant refuge, durant la saison difficile, dans des accumulations organiques. Pirozynski et Malloch (1975) suggèrent que les premiers mycobiontes ont pu être saprophytes: ils auraient alors permis un court-circuit dans les cycles de la matière des écosystèmes primitifs, palliant ainsi la pauvreté des milieux.

En conclusion, les Ptéridophytes paraissent avoir très tôt possédé des associations mutualistes, notamment celles de type VA héritées de leur ancètres dévoniens - mais aussi des associations à partenaires septés apparues plus tardivement (en tout cas absentes des fossiles paléozoïques). La généralité des associations VA ne se dément pas chez les Archégoniates supérieurs, comme nous allons le voir.

LA COLONISATION DU MILIEU TERRESTRE PAR LES ARCHÉGONIATES SUPÉRIEURS (SPERMAPHYTES)

A côté des nombreuses adaptations (tant de l'appareil végétatif que de la reproduction) qui font d'eux des végétaux terrestres, les Préspermaphytes et les Spermaphytes ont conservé des associations avec des champignons. Celles qu'ils établissent avec les racines sont bien connues sous le nom de mycorhizes (tableau 3; Smith & Douglas, 1987). Pour la flore anglaise, Harley et Harley (1987) estiment que 100% des Gymnospermes et 80% des Angiospermes ont des symbiotes mycorhiziens. Nous verrons néanmoins que d'autres associations plus systémiques que les mycorhizes peuvent se mettre en place.

Les Spermaphytes ont développé deux principaux types de mycorhizes

Le premier type de mycorhizes, établi avec un partenaire non septé, est l'endomycorhize à vésicules et arbuscules (VA par abréviation - Nicolson, 1967; Hayman, 1983). Le mycobionte développe un réseau discret d'hyphes à l'extérieur de la racine, jusqu'à 8 cm des tissus racinaires. Le mycelium pénètre à l'intérieur de la racine et reste d'abord intercellulaire. Il forme généralement des renflements inter- ou intra-cellulaires: les vésicules. Le mycélium intercellulaire pénètre le plus souvent à l'intérieur des cellules et forme des structures très ramifiés ou arbuscules. La masse fongique ne dépasse généralement pas 10% de la masse totale de la mycorhize.

Les endomycorhizes à vésicules et arbuscules jouent un rôle essentiel dans l'alimentation en phosphore de la plante hôte (Mosse, 1973; Pearson & Tinker, 1975), ainsi que celle d'autres éléments peu mobiles dans le sol (Gianinazzi-Pearson & Gianinazzi, 1983) et assurent une protection phytosanitaire très efficace des racines contre les agents pathogènes du sol (Schönbeck, 1979; Dehne, 1982).

Ce type mycorhizien ajoute à sa généralité son ancienneté: il est connu au moins depuis le Trias (-230 Ma), où des racines silicifiées d'*Antarcticycas* (proche des Cycadales actuelles) retrouvées en Antarctique, montrent des arbuscules parfaitement reconnaissables (Stubbelfield *et al.*, 1987a, b, c). Ces arbuscules sont parfaitement reconnaissables, quoique plus grossiers que ceux décrits au Dévonien inférieur par Remy *et al.* (1994).

Un autre type de mycorhize est répandu chez les Spermaphytes ligneuses: les ectomycorhizes. Ici, le mycobionte induit des modifications morphologiques de la racine et peut représenter jusqu'à 40% de la masse mycorhizienne. Le champignon forme un manteau autour des racines courtes de l'arbre. De ce manteau partent des hyphes externes ou des cordons mycéliens qui peuvent prospecter le sol jusqu'à plusieurs centimètres ou dizaines de centimètres de la racine. Le mycelium pénètre dans le cortex racinaire, mais reste toujours intercellulaire. Il colonise une ou plusieurs couches de cellules corticales, sans jamais atteindre l'endoderme. Les échanges entre le champignon et l'arbre hôte se font au niveau des hyphes intercellulaires qui forment une structure appelée réseau de Hartig. Les champignons ectomycorhiziens peuvent aussi parfois jouer un rôle dans l'adaptation de l'arbre à certaines caractéristiques du sol comme le calcaire (Lapeyrie, 1990).

Comme dans le cas des mycorhizes VA, le mycobionte ectomycorhizien joue un rôle majeur dans l'alimentation de l'hôte en phosphore ou en éléments peu solubles (Mousain & Salsac, 1982). Il joue en outre un rôle particulièrement important dans l'alimentation en azote de l'arbre (Martin & Botton, 1993) et contribue à l'absorption de l'eau et à son utilisation (Guehl & Garbaye, 1990). Les champignons ectomycorhiziens interfèrent aussi fortement dans le métabolisme hormonal de l'arbre (Gay, 1990). Ils contribuent aussi à la protection phytosanitaire des racines (Marx, 1972).

Inconnues au Paleozoïque, les ectomycorhizes se seraient développées au Crétacé (-140 Ma - Malloch *et al.*, 1980; Pirozynski & Malloch, 1975; Taylor, 1990). Pirozynski souligne que leur répartition dans les deux hémisphères suggère une apparition (même à l'état non mutualiste) avant la fragmentation de la Pangée (vers -150 Ma). L'apparition des ectomycorhizes pourrait être liée à la radiation des Angiospermes, au Crétacé (Berbee & Taylor, 1993; Taylor, 1993b), même si les premiers Angiospermes peuvent être plus anciens (Cleal, 1989). Il y aurait eu substitution des mycobiontes non septés en faveur des Septomycètes, comme nous en avons suggéré l'éventualité dans le cas des lichens et des mycophycobioses. Le changement de spectre de mycobionte pourrait être encore en cours chez certaines familles (Lewis, 1987). En effet, les ectomycorhizes peuvent actuellement coexister avec les endomycorhizes V.A., au sein de plusieurs familles comme exemple les *Salicaceae* ou les *Myrtaceae*. Les deux types de mycorhizes se trouvent sur le même arbre et côte à côte sur une même racine. La substitution, au cours des temps paléontologiques, du partenaire ectomycorhizien [illegible] partenaire endomycorhizien semble avoir été favorisée par certaines conditions écologiques difficile, comme les sols très pauvres ou les climats froids (Malloch *et al.*, 1980).

L'apparition des ectomycorhizes est nettement polyphylétique. La diversité des Spermaphytes, évolutivement éloignés (aussi bien angiospermes que gymnospermes), suggère que les ectomycorhizes sont apparues plusieurs fois (Lewis, 1987, 1991); les Ascomycètes (Tubérales, Pézizales,...) et les divers Basidiomycètes (Agaricales, Aphyllophorales, Astérosporales et divers hypogés rapportés aux Gastéromycètes) impliqués sont également éloignés évolutivement (Lewis, 1973; Malloch, 1987). Les champignons impliqués se rattachent à des groupes de saprophytes (Luttrel, 1974; Lewis, 1973, 1991; Malloch, 1987): le mutualisme serait donc issu dans ce cas du saprophytisme.

Les ectomycorhizes et surtout les endomycorhizes VA peuvent aussi être associées à des procaryotes fixateurs d'azote comme les *Rhizobium* chez les Légumineuses,

les *Frankia* chez un nombre relativement important de familles (*Betulaceae, Myricaceae, Casuarinaceae, Eleagnaceae, Rhamnaceae, Rosaceae, Coriariceae, Datiscaceae,...*) ou les Cyanophytes des *Gunnera* et des *Cycas*.

Certaines Angiospermes montrent des types mycorhiziens particuliers

A côté des ectomycorhizes et des endomycorhizes VA, d'autres types d'associations sont connus chez les Ericales et les *Orchidaceae* en particulier (Smith & Douglas, 1987). Les Ericales possèdent soit des endomycorhizes (dites "éricoïdes"), où le mycobionte forme des pelotons à l'intérieur des cellules corticales de la racine, soit des ectendomycorhizes, où le mycobionte, tout en formant des pelotons, forme un manteau autour des racines (type "arbutoïdes" - Read, 1983; Harley, 1989; Lewis, 1987, 1991). Le mycobionte, ascomycète ou basidiomycète, dérive soit de formes saprophytes, soit de formes parasites: il a néanmoins conservé sa capacité à métaboliser des formes complexes de matière organique (lignine et cellulose). Il peut ainsi contribuer à l'alimentation carbonée de la plante hôte et coloniser des sols mal minéralisés. La faible disponibilité en azote et phosphore minéral de ces sols est compensée par la capacité du mycobionte d'exploiter directement les formes organiques de ces deux éléments. Le mycobionte peut également jouer un rôle de protection de la plante contre un excès de métaux lourds dans les sols (Bradley *et al.*, 1981). De tels milieux se trouvent souvent à des latitudes ou à des altitudes encore plus élevées que celles occupées par les végétaux ectomycorhizés (Lewis, 1987). Lorsque les conditions deviennent encore plus difficiles, des associations éricoïdes cèdent la place aux association lichéniques.

Les *Orchidaceae* ont également développé des stratégies associatives avec des basidiomycètes qui forment des pelotons intracellulaires. Ces pelotons, comme les arbuscules des endomycorhizes VA, ont une durée de vie éphémère et sont rapidement digérés par l'hôte (Hadley, 1975, 1986; Harley & Harley, 1987). Les genres fongiques associés sont par ailleurs connus comme phytopathogènes (*Ceratobasidium, Thanatephorus, Tulasnella, Sebacina,...*). Les mycobiontes des *Orchidaceae* ont également gardé leur capacité à métaboliser la lignine et la cellulose de la matière organique morte. Ils participent donc à l'alimentation carbonée de la plante; la forme de transfert du carbone est en général le tréhalose. Les graines d'*Orchidaceae* sont dépourvues de réserves carbonées. Elles germent en donnant naissance à une structure indifférenciée appelée protocorme, qui est totalement dépendant du mycobionte pour son alimentation carbonée et minérale (Furmann & Trappe, 1971; Hadley, 1986). La plante est initialement mycotrophe. Après différenciation du cormus et développement de la plantule, l'association peut persister: elle se localise alors uniquement dans le système racinaire et est obligatoire pour l'alimentation minérale de la plante. Chez les *Orchidaceae* épiphytes l'association est le plus souvent présente dans les racines aériennes, mais joue semble-t-il un rôle plus mineur.

Les associations des Ericales et des *Orchidaceae* semblent s'être mises en place tardivement (Crétacé ? - voir Lewis, 1987), attestant de la prédisposition des Spermaphytes, comme les Hépatophytes décrites plus haut, à établir des relations avec un partenaire fongique. Il existe d'autres types de mycorhizes à mycobionte septé, moins répandus, comme celles de certaines *Cyperaceae* (Haselwandter & Read, 1982): volon-

tairement, nous nous limitons à esquisser la diversité des mycorhizes (tableau 3), abondemment étudiée par ailleurs (Smith & Douglas, 1987).

De nombreuses associations montrent [redacted] dérive vers la mycotrophie stricte

Plus de 400 espèces d'angiospermes sont mycotrophes (Furmann & Trappe, 1971; Hadley, 1986; Leake, 1994), état qui semble être apparu à plusieurs reprises au sein de groupes possédant des mycorhizes. Abondantes en milieux tropicaux, ces plantes partagent diverses caractéristiques, comme leurs habitats ombragés, riches en matière organique, l'absence de parties aériennes développées (Leake, 1994) et leur importante production de graines (Leake, 1994): mais avant tout, elles sont dépourvues de chlorophylles et dépendantes du partenaire fongique pour leur alimentation carbonée (on [redacted] même pu les qualifier de "mycoparasites). Signalons que le mycobionte peut assurer le transfert du carbone réduit entre des photobiontes vrais qu'il mycorhize simultanément. Ce processus est décrit pour les ectomycorhizes (Brownlee *et al.*, 1983) comme pour les endomycorhizes (Francis & Read, 1984): il semble ouvrir la voie vers la mycotrophie, dont nous allons voir qu'elle émerge par plusieurs fois chez les Angiospermes.

Chez les dicotylédones, les *Polygalaceae* et certaines *Gentianaceae* (Knöbel & Weber, 1988) sont mycotrophes: ces dernières possèdent des associations de type VA, bien que les arbuscules laissent parfois la place à des pelotons chez les *Gentianaceae* (phénomène décrit même chez des espèces non mycorhiziennes - McGee, 1985). Des dérives vers l'hétérotrophie s'observent chez les Ericales (Read, 1983): les *Pyrolaceae* présentent des ectendomycorhizes et les *Monotropaceae* montrent des associations ectendomycorhiziennes où le champignon forme simultanément un manteau et des suçoirs intracellulaires (type "monotropoïde": Duddridge & Read, 1982). Les mycobiontes des Ericales sont, quant à eux, des ascomycètes et des basidiomycètes.

Chez les Monocotylédones, deux ordres présentent des mycotrophes: les Triuridales (les *Triuridaceae* présenteraient des associations de type VA - Hadley, 1986) et les Orchidales qui comprennent deux grandes familles mycotrophes, les *Burmanniaceae* (à associations VA - Terashita & Kawakami, 1991) et les *Orchidaceae*. Les *Orchidaceae* mycotrophes présentent des basidiomycètes endophytes semblables à ceux des Orchidées autotrophes.

L'apport carboné repose ici sur le partenaire fongique, qui est lui-même saprophyte, ou parasite (voire mutualiste chez les *Monotropaceae*) d'un autre phototrophe. Toutefois, le champignon semble également profiter de l'association, comme en attestent les expériences de croissance *in vitro* en présence d'extrait de la plante-hôte (Björkman, 1960). Ces relations, où le rôle du champignon dans l'apport carboné est "renversé", évoquent fortement celles observées chez certains Hépatophytes et dans les gamétophytes des Ptéridophytes inférieures, également mycotrophes. Dans le cas des Angiospermes, cet état est nettement secondaire dans l'évolution. La tendance à la mycotrophie paraît donc récurrente chez les Archégoniates.

Des mycobiontes systémiques existent chez les Spermaphytes

Les champignons mycorhiziens ne restent pas toujours limités aux racines (Taber & Trappe, 1982), mais les exceptions sont rares. A côté de ces mycobiontes, de

nombreux endophytes existent dans d'autres organes de ces végétaux, dont la description reste à faire (Hawkworth, 1990). En particulier, des associations avec les feuilles ou "mycophylles" seraient anciennes et aussi fréquentes que les mycorhizes (Lewis, 1987, Caroll, 1988).

L'exemple des Ascomycètes (*Clavicipitaceae*) endophytes des *Poaceae* (Graminées) et des *Cyperaceae* est le mieux étudié (Siegel *et al.*, 1987; Clay, 1988 a, b). De telles associations, très fréquentes chez certaines espèces (White, 1987), dérivent probablement de relations parasitaires (Clay, 1988b). Le champignon a bien souvent perdu sa sexualité et se transmet par les propagules de l'hôte qu'il envahit (Siegel *et al.*, 1987). Cette association semble bénéfique à la plante car les alcaloïdes produits par le mycobionte ont un effet toxique et déterrent sur les herbivores. Cependant, la présence du mycobionte serait bénéfique même en l'absence d'herbivores (Siegel *et al.*, 1987).

Dans ce type de mutualisme, comme dans le cas des mycophycobioses étudiées plus haut, le rôle du champignon, qui reste intercellulaire, n'est pas absorptif, et contribue probablement peu à l'adaptation au milieu terrestre. Mais cet exemple souligne bien que la plupart des Spermaphytes sont des organismes essentiellement mutualistes. L'acquisition de nouveaux mycobiontes par les Spermaphytes, semble donc avoir eu lieu plusieurs fois au cours de l'évolution. La transition du parasitisme vers l'endophytisme non pathogène semble pouvoir être simple et rapide. Elle a pu être observée lors de récents travaux, montrant que la mutation d'un seul gène suffit à transformer le pathogène *Colletrichum magna* en un endophyte n'entraînant aucun symptôme (Freemann & Kodergerez, 1993). Si dans ce cas, on ne peut strictement parler de mutualisme, un effet phytosanitaire positif est observé. La tolérance par l'hôte du partenaire fongique, sans dégâts apparents ("parasitisme sans symptomes" au sens de Lewis, 1973) ouvre la voie à la l'établissement du mutualisme.

Il existe quelques familles de Spermaphytes secondairement aposymbiotiques

A l'inverse, certains groupes auraient secondairement perdu toute association mycorhizienne (Tester *et al.*, 1987). Ce sont les familles, d'affinités évolutives variées (*Brassicaceae*, *Cyperaceae*, *Juncaceae*, groupe des *Centrospermae*, mais aussi quelques espèces de *Chenopodiaceae* et *Polygonaceae*) qui ne possèdent plus de mycorhizes. Le passage à l'état aposymbiotique s'est probablement opéré à plusieurs reprises. Les espèces concernées sont pratiquement toutes herbacées, et développent (en compensation ?) un important chevelu racinaire et d'abondants poils absorbants (voir notamment Baylis, 1972 et St John, 1980). Ces végétaux dépourvus de mycorhizes se rencontrent le plus souvent dans des milieux perturbés, où l'alimentation minérale n'est pas limitante.

Pirozynski (1981) considère que l'existence de végétaux libérés de l'association endomycorhizienne atteste paradoxalement de l'ancienneté de celle-ci, et d'une dérive vers des relations facultatives au sein des ectomycorrhiziens. L'évolution du partenaire phototrophe est donc parvenue, au cours des temps géologiques, à lui procurer toutes les adaptations nécessaires à l'homéohydrie en milieu terrestre. Cette stratégie aposymbiotique, bien que moins "coûteuse" parce que ne nécessitant pas d'alimenter un partenaire hétérotrophe, n'a cependant pas réussi à supplanter celle des phototrophes associatifs dans tous les milieux. Affranchi de la nécessité de trouver le partenaire fongique, ces végétaux peuvent par exemple coloniser certains milieux perturbés.

D'éventuels transferts horizontaux de gènes restent à prouver

Certains auteurs suggèrent que des transferts génétiques horizontaux ont pu ou peuvent avoir eu lieu entre les deux partenaires, comme dans le cas des mutualismes endocellulaires (mitochondries, chloroplastes - Margulis, 1993). Ces transferts ont surtout été évoqués dans l'évolution des Angiospermes. Théoriquement, des champignons biotrophes, même parasites, en contact permanent avec les tissus de l'hôte, auraient pu transmettre des gènes à celui-ci (Lamboy, 1984), voire servir de relai pour des transferts à partir d'autres organismes (insectes, par exemple: Pirozynski, 1988, 1991). Ainsi, des gènes impliqués dans la cécidiogénèse seraient devenus des déterminants de la morphogénèse normale de l'hôte, expliquant l'apparition des fleurs (Pirozynski, 1988, 1991). Il n'existe néanmoins aucune preuve moléculaire d'un tel transfert. Bien au contraire, les données actuelles de la biologie du développement des végétaux supérieurs ont permis de confirmer l'universalité des gènes homéotiques, qui rend élégamment compte de la morphogénèse des pluricellulaires sans exiger plus d'hypothèses. Semblablement, l'hypothèse d'un transfert horizontal de gène(s) pour expliquer le comportement des partenaires au sein des lichens (Ahmadjian, 1992) paraît peu fondée.

L'existence de formes filamenteuses (tube pollinique, Angiospermes parasites,...) et de stades hétérotrophes (graine, pollen,...) chez les Spermaphytes conduit Atstatt (1988, 1991) à considérer que les plantes sont des chimères de tissus d'algues et de champignons. Jusqu'ici et à notre connaissance, aucune donnée moléculaire ne va dans le sens de cette hypothèse. De simples évolutions convergentes suffisent à expliquer l'existence de structures filamenteuses.

CONCLUSION: COEVOLUTION AU COURS DE LA COLONISATION DU MILIEU TERRESTRE ?

Au cours de l'évolution des phototrophes, l'apparition d'associations mutualistes avec les champignons est récurrente (tableau 4). Elle a abouti à une grande variété de types d'association, chacun polyphylétique: lichens, mycophycobioses, mycothalles, mycorhizomes et mycorhizes (tableaux 2 et 3). Ces mutualismes prolongent la longue série d'associations symbiotiques qui ont ponctué l'évolution (Le Tacon & Selosse, 1994). Les endosymbioses impliquant des Cyanophytes et conduisant à la mise en place des plastes sont l'exemple d'une autre association entre autotrophes et hétérotrophes dont les conséquences évolutives ont été majeures (Raven, 1987; Margulis, 1993). Les associations champignons-phototrophes semblent constituer une adaptation à une vie terrestre ou sub-terrestre. Le saut évolutif que représente leur mise en place permet notamment d'expliquer la rapidité d'apparition des Archégoniates au Silurien.

Peut-on observer une coévolution au sein de chacun de ces types d'associations ? Il s'agit tout d'abord de définir ce terme, qui peut être large (Pirozynski & Hawksworth, 1988) ou plus étroit (Scannerini & Bonfante-Fasolo, 1989). Une tentative de définition pertinente de la coévolution sort toutefois du cadre de cette revue. On peut se demander, simplement, dans quelle mesure le mycobionte a influé sur le photobionte, et inversement, au cours de longues périodes d'évolution conjointe. La réponse

TABLEAU 4 : Echelle stratigraphique et récapitulation des principaux évènements paléontologiques mentionnés dans le texte (les résultats provenant d'horloges moléculaires ne sont pas mentionnés : Ma = millions d'années).

CENOZO.		QUATERNAIRE	Tous les groupes de végétaux terrestres interagissent avec des mycobiontes.
	1.8 Ma		
		NEOGENE	
	25 Ma		
		PALEOGENE	Premiers lichens fossiles connus
	65 Ma		
MESOZOIQUE		CRETACE	Apparition des Anthocérotophytes, diversification des Angiospermes Origine des mycorhizes à mycobionte septés (ectomycorhizes notamment) ?
	140 Ma		
		JURASSIQUE	Début de la dislocation de la Pangée
	200 Ma		
		TRIAS	Arbuscules fossiles sur un préspermaphyte, *Antarcticycas*
	230 Ma		
PALEOZOIQUE		PERMIEN	Origine spéculée des lichens
	280 Ma		
		CARBONIFERE	Nombreux Ptéridophytes à mycobiontes non septes Premiers fossiles indiscutables de champignons septés (Septomycètes)
	345 Ma		
		DEVONIEN	Fin du Dévonien : premiers fossiles de Bryophytes au sens strict Début du Dévonien : première flore terrestre diversifiée, dont celle de Rhynie qui présente les premières associations vésiculo-arbusculaires Premiers fossiles de Glomales et de Charophycées
	395 Ma		
		SILURIEN	Fin du Silurien : premiers fossiles d'Hépathophytes Premiers fossiles de Trachéophytes (*Cooksonia*) Premiers fossiles de champignons non septés terrestres
	435 Ma		
		ORDOVICIEN	Premiers débris rapportés à une végétation terrestre (spores, cuticules...)
	500 Ma		
		CAMBRIEN	
	570 Ma		
PRECAMBRIEN			Les principaux groupes d'algues existent à la fin du Précambrien Existence de phototrophes terrestres (Cyanophytes ?)

Source : MNHN, Paris

paraît contrastée selon que l'on s'intéresse aux mycobiontes non septés (Glomales) ou aux Septomycètes.

Les associations à vésicules et arbuscules semblent inchangées depuis le Paléozoïque (Dévonien, - 450Ma). La présence du mycobionte non septé a permis la diversification des photobiontes, c'est-à-dire, la radiation évolutive des Archégoniates. Le faible nombre actuel de Glomales indique qu'il n'y a pas eu spéciation conjointe du partenaire fongique. Le mycobionte semble avoir perdu une partie de son patrimoine génétique et être devenu incapable de se développer en l'absence du photobionte, qui supplée aux voies métaboliques fongiques disparues. Cette évolution régressive, qui accompagne fréquemment la biotrophie, s'apparente à celle des plastes qui ont aussi perdu au cours de l'évolution une partie importante de leur génôme. Chez les Glomales, cette simplification s'est probablement produite très rapidement lors de la mise en place de l'association. Elle a eu pour conséquence, avec la dépendance qui en découle et la perte de la sexualité, de limiter toute évolution ultérieure. Cela pourrait notamment expliquer l'absence de spécificité des associations endomycorhiziennes à vésicules et arbuscules. Il y aurait eu évolution des Archégoniates "en présence" du mycobionte, mais sans évolution en retour de celui-ci.

Cet immobilisme a probablement concouru à favoriser l'apparition progressive d'associations entre les Archégoniates et des champignons septés (Septomycètes, tableau 3). C'est ainsi que, chez certaines Hépatophytes, les Ericales, les *Orchidaceae*, et les arbres forestiers, des associations à mycobiontes septés ont pu remplacer les associations primitives, probablement à partir du Crétacé (date d'apparition des Angiospermes, chez qui ces associations sont fréquentes). Le remplacement conduisant aux ectomycorhizes chez les arbres forestiers semble encore en cours, comme le montrent les espèces arborescentes qui présentent les deux types d'association. Ces nouveaux types d'association auraient permis aux photobiontes de coloniser des milieux plus difficiles: sols riches en matière organique qu'exploitent les mycobiontes, ou sols minéraux particulièrement pauvres où les mycobiontes ont accès à des formes minérales peu ou pas solubles.

Les mycobiontes septés ont, quant à eux, conservé leur sexualité et leurs potentialités génétiques - ils peuvent d'ailleurs pour la plupart être cultivés en l'absence de la plante hôte. Cette plasticité génétique explique peut-être une opposition remarquable: les forêts ectomycorhizées (tempérées caducifoliées ou non, tropicales à *Dipterocarpaceae*, *Cesalpinaceae* ou *Eucalyptus*) montrent une diversité réduite d'essences ligneuses associée à une forte diversité d'ectomycorhiziens, tandis que les forêts tropicales endomycorhizées comportent une grande variété d'essences associées à un cortège endomycorhizien paucispécifique (Malloch *et al.*, 1980; Durrieu, 1993). L'adaptation aux conditions stationnelles serait essentiellement réalisée par le mycobionte, qui conserve sa plasticité dans le premier cas.

La conservation de la sexualité autorise également une coévolution avec la plante hôte, comme en témoigne l'émergence de mycobiontes spécifiques. La plupart des genres ligneux à ectomycorhizes possèdent ainsi des mycobiontes spécifiques: *Suillus grevillei*, par exemple, est strictement inféodé au genre *Larix*. La spécificité ne concerne toutefois que le mycobionte, et l'arbre s'associe toujours à un grand nombre de partenaires fongiques, qui lui confèrent d'ailleurs une capacité d'adaptation accrue. La coévolution se produit au sein d'ordres ou de genres de photobiontes, mais, à des

échelons supérieurs, les mycobiontes semblent se transférer d'un groupe systématique à l'autre. Les ectomycorhiziens sont communs à des familles de Gymnospermes et d'Angiospermes; les ascomycètes endomycorhiziens sont communs aux Ericales et à certaines Hépatophytes (Duckett & Read, 1995); les basidiomycètes endomycorhiziens sont peut-être communs aux *Orchidaceae* et à certaines Hépatophytes. Il y a là, dans la mesure où ces organismes coexistent souvent dans les mêmes écosystèmes, une possible transmission horizontale, et l'on est tenté de parler de "contagion écologique" selon le terme de Durrieu, 1993.

Chez les lichens, un remplacement des Glomales par les Septomycètes pourrait s'être produit. En effet, les premiers lichens ont pu impliquer des mycobiontes non septés, comme l'actuel *Geosiphon piriforme*, Glomale associé à des Cyanophytes. On peut émettre l'hypothèse que les mycobiontes primitifs auraient été remplacés (écologiquement, ou dans les associations elles-mêmes) par des Ascomycètes ou des Basidiomycètes. Chez les lichens actuels, l'existence d'une coévolution entre les partenaires reste à déterminer. La mise en place de structures communes (Honegger, 1993) et la rareté des photobiontes à l'état aposymbiotique suggèrent toutefois une coévolution, même s'il n'y a pas de grande spécificité dans l'association. A l'inverse de leurs photobiontes, les mycobiontes septés pourraient avoir subi une radiation, suite à l'émergence de l'état lichénique (Gargas *et al.*, 1995).

La variété des associations existantes permet donc l'adaptation à tous les milieux terrestres susceptibles d'être colonisés, soit par évolution du photobionte ou du mycobionte, soit par coévolution des deux partenaires. L'universalité de ces associations mutualistes reste souvent ignorée des physiologistes, qui ont souvent tendance à étudier les phototrophes terrestres sans tenir compte de la présence de partenaires fongiques. C'est pourtant une donnée majeure de la physiologie et de l'évolution de ces organismes.

REMERCIEMENTS - Ce travail doit beaucoup aux documents et aux informations fournis par A. Bellemere, B. Boullard, J. Dexheimer, J.G. Duckett, R. Honegger, M. Kluge, J. Kohlmeyer, F. Oberwinkler, E. Schmid et C. Van Haluwyn. Il a également profité des observations constructives d'un relecteur anonyme. Que tous soient chaleureusement remerciés de leur contribution, ainsi que toute l'équipe du Laboratoire de Microbiologie Forestière de l'INRA à Nancy pour son soutien.

BIBLIOGRAPHIE

AHMADJIAN V., 1967 - A guide to algae occuring as lichen symbionts: isolation, culture, cultural physiology and identification. *Phycologia*, 6 (2/3): 127-160.

AHMADJIAN V., 1992 - Basic mechanisms of signal exchange, recognition and regulation in lichens. *In* Algae and symbiosis: plants, animals, fungi, viruses, interactions explored, Reisser W. ed., Biopress Ltd, Bristol. Pp. 673-697.

ATSTATT P.R., 1988 - Are vascular plants "inside-out" lichens ? *Ecology*, 69: 17-23.

ATSTATT P.R., 1991 - Fungi and the origine of land plants. *In* Symbiosis as ■ evolutionary innovation in speciation and morphogenesis, L. Margulis et R. Fester ed., Massachusetts Institute of Technology Press, Cambridge, Mass., U.S.A. Pp. 301-315.

BARGHOORN E.S. and TYLER S.A., 1965 - Microorganisms from the Gunflint Chert. *Science*, 147: 563-577.

BAYLIS, G.T.S., 1972 - Fungi, phosphorus and the evolution of root systems. *Search*, 3(7): 257-258.

BERBEE M.L. and TAYLOR J.W., 1993 - Dating the radiations of the true fungi. *Can. J. Bot.*, 71: 1114-1127.

BERCH S.M. and KENDRICK B., 1982 - Vesicular-arbuscular mycorrhizae of Southern Ontario ferns and ferns-allies. *Mycologia*, 74(5): 769-776.

BIERHORST D.W., 1953 - Structure and developpement of the gametophyte of *Psilotum nudum*. *Am. J. Bot.*, 40: 649-658.

BJÖRKMAN E., 1960. *Monotropa hypopitys* L. - an epiparasite on tree roots. *Physiol. Plant.*, 13: 308-327.

BOULLARD B., 1979 - Considérations sur la symbiose fongique chez les Ptéridophytes. *Syllogeus*, 19: 1-58.

BOULLARD B., 1988 - Observations on the coevolution of fungi with hepatics. *In* Coevolution of fungi with plants and animals, K.A. Pirozynski et D.L. Hawksworth ed., Academic Press, Londres. Pp. 107-124.

BOULLARD [redacted]. et LEMOIGNE Y., 1971 - Les champignons endophytes du *Rhynia Gwynne-Vaughanii*: étude morphologique et déductions sur leur biologie. *Le Botaniste*, ser. LIV (1-6): 49-89.

BOUREAU E., LEJAL-NICOL A. et MASSA D., 1978 - A propos du Silurien et du Dévonien en Lybie. Il faut reporter au Silurien la date d'apparition des plantes vasculaires. *C. R. Acad. Sci.*, ser. D, 286: 1567-1571.

BRADLEY R., BURT A.J. and READ D.J., 1981 - Mycorrhizal infection and resistance to heavy metal toxicity in *Calluna vulgaris*. *Nature*, 292: 335-337.

BRODO I.M., 1976 - *Lichenes canadenses exsiccati*: fascicle II. *The Bryologist*, 79: 385-405.

BROWNLEE C., DUDDRIDGE J.A., MALIBARI A. and READ D.J., 1983 - The structure and function of mycelial systems of ectomycorrhizal roots with special reference to their role in forming inter-plant connections and providing pathways for assimilate and water transport. *Plant and Soil*, 71: 433-443.

BURGESS N.D. and EDWARDS F.L.S., 1988 - A new palaeozoic plant closely allied to *Prototaxites* Dawson. *Bot. J. Linn. Soc.*, 97: 189-203.

CAIN, R. F., 1972 - Evolution of fungi. *Mycologia*, 64: 1-14.

CAROLL G., 1988 - Fungal endophytes in stems and leaves: from latent pathogen to mutualistic symbiont. *Ecology*, 69: 2-9.

CARRE C.G. and HARRISON R.W., 1961 - Studies on vesicular-arbuscular endophytes III - an endophyte of *Conocephalum conicum* (L.) Dum. identified with a strain of *Pythium*. *Trans. Brit. mycol. Soc.*, 44 (4): 565-572.

CAVALIER-SMITH T., 1987 - The origin of fungi and pseudofungi. *In* Evolutionary biology of the fungi, Rayner A.D.M., Brasier C.M. et Moore D.M. ed., Cambridge University Press, Cambridge. Pp. 339-354.

CHADEFAUD M., 1972 - Sur les cycles des Champignons comparés à ceux des Algues. *In* Colloque sur les lichens et la symbiose lichénique. Mém. Soc. Bot. France. Pp. 79-111.

CHURCH A.H., 1921a - The lichens as transmigrant. *Journal of Botany*, (Londres), 59: 7-13.

CHURCH A.H., 1921b - The lichens as transmigrant. *Journal of Botany*, (Londres), 59: 40-46.

CLAY K., 1988a - Fungal endophytes of grasses: a defensive mutualism between plants and fungi. *Ecology*, 69: 10-16.

CLAY K., 1988b - Clavicipitaceous fungal endophytes of grasses: coevolution and the change from parasitism to mutualism. *In* Coevolution of fungi with plants and animals, K.A. Pirozynski et D.L. Hawksworth ed., Academic Press, Londres. Pp. 79-105.

CLEAL C.J., 1989 - Evolution in hidden forest. *Nature*, 339: 16.

CONWAY MORRIS S. and ROBINSON R.A., 1988 - More soft-bodied animals and algae from the middle cambrian of Utah and British Columbia. The University of Kansas Paleontological Contributions, paper 122. Pp. 1-48.

COOPER K.M., 1976 - A field survey of mycorrhizas in New Zealand ferns. *New Zeal. Journ. Bot.*, 14: 169-181.

COOPER K.M., 1977 - Endomycorrhizas affect growth of *Dryopteris filix-mas*. *Trans. Brit. mycol. Soc.* 69(1): 161-164.

CRANDALL-STOTLER B., 1986 - Morphogenesis, developmental anatomy and bryophyte phylogenetics: contraindications of monophyly. *J. Bryol.*, 14: 1-23

CRIDLAND A.A., 1962 - The fungi in cordaitean rootlets. *Mycologia*, 54: 230-234.

DEHNE H.W., 1982 - Interaction between vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi and plant pathogens. *Phytopathol.*, 72(8): 1115-1119.

DEMOULIN V., 1974 - The origin of Ascomycetes and Basidiomycetes. The case for ■ red algal ancestry. *Bot. Rev.*, 40: 315-345.

DEMOULIN V., 1985 - The red alga-higher fungi phylogenetic link: the last ten years. *Biosystems*, 18: 347-356.

DENISON W.C. and CARROLL G.C., 1966 - The primitive ascomycete: ■ new look at an old problem. *Mycologia*, 58: 249-269.

DUCKETT J.G. and CLYMO R.S., 1988 - Regeneration of bog liverworts. *New Phytol.*, 110: 119-127.

DUCKETT J.G. and LIGRONE R., 1992 - A light and electron microscope study of the fungal endophytes in the sporophyte and gametophyte of *Lycopodium cernuum* with observations on the gametophyte-sporophyte junction. *Can. J. Bot.*, 70: 58-72.

DUCKETT J.G. and READ D.J., 1991 - The use of the fluorescent dye, 3,3' dihexyloxacarbocyanine iodide, for selective staining of ascomycetes fungi associated with liverwort rhizoids and ericoid mycorrhizal roots. *New Phytol.*, 118: 259-272.

DUCKETT J.G. and READ D.J., 1995 - Ericoid mycorrhizas and rhizoid-ascomycete associations in liverwort share the same mycobiont: isolation of the partners and resynthesis of the associations *in vitro*. *New Phytol.*, 118: 439-447.

DUCKETT J.G. and RENZAGLIA K.S., 1988 - Symbiotic ascomycetes associated with the rhizoids of jungermannialian hepatics. *Am. J. Bot.*, 75: 2.

DUCKETT J.G., RENZAGLIA K.S. and PELL. K., 1991 - A light and electron microscope study of the rhizoid-ascomycete associations and flagelliform axes in british hepatics with observations on the effects of the fungi on host morphology. *New Phytol.*, 118: 233-257.

DUCKETT J.G., RENZAGLIA K.S., PELL. K. and RUSSEL A., 1989 - The biology of underground organs in the Jungermanniales. *Bull. Brit. Bryol. Soc.*, 53: 19-21.

DUDDRIDGE J.A. and READ D.J., 1982 - An ultrastructural analysis of the development of mycorrhizas in *Monotropa hypopitys* L. *New Phytol.*, 92: 203-214.

DURRIEU G., 193 - Ecologie des champignons.Masson, Paris. 207 p.

EDWARDS D.S., 1986 - *Aglaophyton major*, ■ non-vascular land-plant from the devonian Rhynie chert. *Bot. J. Linn. Soc.*, 93: 173-204.

EDWARDS D., DUCKETT J.G. and RICHARDSON J.B., 1995 - Hepatic characters in the earliest land plant. *Nature*, 374: 635-636.

EDWARDS D., FANNING U. and RICHARDSON J.B., 1986 - Stomata and sterome in early land plants. *Nature*, 323: 438-440.

EDWARDS D. and FANNING U., 1985 - Evolution and environment in the late Silurian - early Devonian: the rise of pteridophytes. *Phil. Trans. R. Soc. Lond.*, ser. B, 309: 147-165.

EDWARDS D.S. and LYON A.G., 1983 - Algae from the Rhynie Chert. *Bot. J. Linn. Soc.*, 86: 37-55.

ENSMINGER P.A., 1993 - Control of development in plants and fungi by far-UV radiation. *Physiol. Plant.*, 88: 501-508.

ERIKSSON O.E., 1981 - The families of bitunicate ascomycetes. *Opera Botanica*, 60: 1-220.

ERWIN D.H., 1994 - The permo-triassic extinction. *Nature*, 367: 231-236.

FRANCIS R. and READ D.J., 1984 - Direct transfert of carbon between plants connected by vesicular-arbuscular mycorrhizal mycelium. *Nature*, 307: 53-56.

FREDERICK S.E., GRUBER P.J. and TOLBERT N.E., 1973 - The occurence of glycolate dehydrogenase and glycolate oxidase in green plants. *Plant Physiol.*, 52: 318-323.

FREEBERG J.A., 1962 - *Lycopodium* prothalli and their endophytic fungi as studied *in vitro*. *Am. J. Bot.*, 49: 530-535.

FREEBERG J.A. and WETMORE R.H., 1957 - Gametophytes of *Lycopodium* as grown *in vitro*. *Phytomorphology*, 7(2): 204-217.

FREEMANN S. and RODRIGUEZ R.J., 1993 - Genetic conversion of a fungal plant pathogen to a nonpathogenic, endophytic mutualist. *Science*, 260: 75-78.

FRIEDMANN E.I., 1982 - Endolithic microorganismes in the antarctic cold desert. *Science*, 215: 1045-1053.

FRIES L., 1988 - *Ascophyllum nodosum* (Phaeophyta) in axenic culture and its response to the endophytic fungus *Mycosphaerella ascophylli* and epiphytic bacteria. *J. Phycol.*, 24: 333-337.

FRIES N., 1979 - Physiological characteristics of *Mycosphaerella ascophylli*, ▪ fungal endophyte of the marine brown alga *Ascophyllum nodosum*. *Physiol. Plant.*, 45: 117-121.

FRIES N., 1980 - Chemical factors affecting ascospore germination and mycelium development in *Mycosphaerella ascophylli* Cotton. *Bot. Mar.*, : 623-628.

FURMAN T.E. and TRAPPE J.M., 1971 - Phylogeny and ecology of mycotrophic achlorophyllous angiosperms. *Quart. Rev. Biol.*, 46: 219-225.

GARBARY D.J. and GAUTAM A., 1989 - The *Ascophyllum*, *Polysiphonia*, *Mycosphaerella* symbiosis - I. Population ecology of *Mycosphaerella* from Nova Scotia. *Bot. Mar.*, 32: 181-186.

GARGAS A., DEPRIEST P.T., GRUBE M. and TEHLER A., 1995 - Multiple origins of lichen symbioses in fungi suggested by SSU rDNA phylogeny. *Science*, 268: 1492-1495.

GARTNER G., 1992 - Taxonomy of symbiotic eukaryotic algae. *In* Algae and symbiosis: plants, animals, fungi, viruses, interactions explored, Reisser W. ed., Biopress Ltd, Bristol. Pp. 325-338.

GAY G., 1990 - Effect of the ectomycorrhizal fungus *Hebeloma hiemale* on adventitious root formation in derooted *Pinus halepensis* shoot hypocotyls. *Can. J. Bot.* 68: 1265-1270.

GIANINAZZI-PEARSON V. and GIANINAZZI S., 1983 - The physiology of vesicular-arbuscular mycrrohizal roots. *Plant and Soil*, 71: 197-209.

GRAHAM L.E., DELWICHE C.F. and MISHLER B.D., 1991 - Phylogenetic connections between the "Green Algae" and the "Bryophytes". *Adv. Bryol.*, 4: 213-244.

GRAY J., 1985 - The microfossil record of early land plants: advances in understanding of early terrestrialization, 1970-1984. *Phil. Trans. R. Soc. Lond.*, ser. B, 309: 167-195.

GRAY J and BOUCOT A.J., 1979 - The devonian plant *Protosalvinia*. *Lethaia*, 12: 57-63.

GUEHL J.M. and GARBAYE J., 1990 - The effect of ectomycorrhizal status on carbon dioxide assimilation capacity, water-use efficiency and response to transplanting in seedlings of *Pseudo-Tsuga menziesii* (Mirb) Franco. *Ann. Sci. For.*, 21: 551-563.

HADLEY G., 1975 - Organization and fine structure of orchid mycorrhiza. *In* Endomycorrhizas, Sanders F.E., Mosse B; et Tincker P.B., Academic Press, Londres et New-York. Pp. 335-351.

HADLEY G., 1986 - Mycorrhizas of heterotrophic plants. *In* Physiological and genetical aspects of mycorrhizae, V. Gianinazzi-Pearson et S. Gianinazzi ed., INRA Paris. Pp. 815-819.

HALLBAUER D.K., JAHNS H.M. and BELTMAN H.A., 1977 - Morphological and anatomical observations on some Precambrian plants from the Witwatersrand, South Africa. *Geol. Rundschau*, 66: 477-491.

HARLEY J.L., 1989 - The significance of mycorrhiza. *Mycol. Res.*, 92(2): 129-139.

HARLEY J.L. and HARLEY E.L., 1987 - A check-list of mycorrhiza in the british flora. *New Phytol.* (suppl.), 105: 1-102.

HASELWANDTER H. and READ D.J., 1982 - The significance of a root-fungus association in two carex species of high-alpine plant communities. *Oecologia*, 53: 352-354.

HAWKES M.W., 1983 - Anatomy of *Apophlaea sinclarii* - an enigmatic red alga endemic to New Zealand. *Jap. J. Phycol.* (Sôrui), 31: 55-64.

HAWKSWORTH D.L., 1987 - Observations on three algicolous microfungi. *Notes from the Royal Botanical Garden Edinburgh*, 44: 549-560.

HAWKSWORTH D.L., 1988a - Coevolution of fungi with algae and cyanobacteria in lichen symbioses. *In* Coevolution of fungi with plants and animals, K.A. Pirozynski et D.L. Hawksworth ed., Academic Press, Londres. Pp. 125-148.

HAWKSWORTH, D.L., 1988b - The variety of fungal-algal symbioses, their evolutionary significance, and the nature of lichens. *Bot. J. Lin. Soc.*, 96: 3-20.

HAWKSWORTH, D.L., 1990 - The fungal dimension of biodiversity: magnitude, significance and conservation. *Mycol. Res.*, 95(6): 641-655.

HAYMAN D.S., 1983 - The physiology of vesicular-arbuscular endomycorrhizal symbiosis. *Can. J. Bot.*, 61: 944-963.

HEPDEN P.M., 1960 - Studies on vesicular-arbuscular endophytes II: endophytes in the Pteridophyta with special reference to leptosporangiate ferns. *Trans. Brit. myc. Soc.*, 43: 559-570.

HOLLOWAY J.E., 1917 - The protothallus and young plant of *Tmesipteris*. *Trans. New Zeal. Inst.*, 50: 1-44.

HONEGGER R., 1991 - Fungal evolution: symbiosis and morphogenesis. *In* Symbiosis as a evolutionary innovation in speciation and morphogenesis, L. Margulis et R. Fester ed. Massachusetts Institute of Technology Press, Cambridge, Mass., U.S.A. Pp. 319-340.

HONEGGER R., 1993 - Developmental biology of lichens. *New Phytol.*, 125: 659-678.

HORODYSKI R.J. and KNAUTH L.P., 1994 - Life on land in the Precambrian. *Science*, 263: 494-498.

JEFFREY C., 1962 - The origin and differentiation of the Archegoniate land-plants. *Bot. Not.*, 115: 446-454.

KENDRICK B., 1991 - Fungal symbioses and evolutionary innovations. *In* Symbiosis [redacted] a evolutionary innovation in speciation and morphogenesis, L. Margulis et R. Fester ed. Massachusetts Institute of Technology Press, Cambridge, Mass., U.S.A. Pp. 249-261.

KHAN A.G. and BELIK M., 1995 - Occurence and ecological significance of mycorhizal symbiosis in aquatic plants. *In* Mycorrhiza, A. Varma et [redacted]. Hock ed., Springer-Verlag Berlin Heidelberg. Pp. 627-666.

KIDSTON R. and LANG H.W., 1921 - On old red sandstone plants showing structure, from the Rhynie Chert bed, Aberdeenshire. *Trans. R. Soc.* (Edinburgh), 52: 855-902.

KINGHAM D.L. and EVANS L.V., 1986 - The *Pelvetia-Mycosphaerella* interrelationship. *In* The biology of marine fungi, S.T. Moss ed., Cambridge University Press, Cambridge. Pp. 177-187.

KLUGE M., MOLLENHAUER D. and MOLLENHAUER R., 1991 - Photosynthetic carbon assimilation in *Geosiphon pyriforme* (Kützing) F.v. Wettstein, an endosymbiotic association of fungus and cyanobacterium. *Planta*, 185: 311-315.

KLUGE M., MOLLENHAUER D., MOLLENHAUER R. and KAPE R., 1992 - *Geosiphon pyriforme*, an endosymbiotic consortium of a fungus and [redacted] cyanobacterium (Nostoc) fixes nitrogen. *Bot. Acta*, 105: 343-344.

KNÖBEL von M. and WEBER H.C., 1988 - Observations on mycorrhizae of *Gentiana verna* L. and *Voyria truncata* (Stand.) Stand. and Stey. *Beiträge zur Biologie der Pflanzen*, 63: 463-477.

KNOLL A., 1992 - The early evolution of eucaryotes: a geological perspective. *Science*, 256: 622-627.

KOBLUK D.R. and JAMES N.P., 1979 - Cavity-dwelling organisms in lower-Cambrian patch reefs from southern Labrador. *Lethaia*, 12: 193-218.

KOHLMEYER J., 1975 - New clues to the possible origin of Ascomycetes. *BioScience*, 25: 86-93.

KOHLMEYER J. and DEMOULIN V., 1981 - Parasitic and symbiotic fungi on marine algae. *Bot. Mar.*, 24: 9-18.

KOHLMEYER J. and HAWKES M.W., 1983 - A suspected case of mycophycobiosis between *Mycosphaerella apophleae* (Ascomycetes) and *Apophlaea* spp. (Rhodophyta). *J. Phycol.*, 19, 257-260.

KOHLMEYER J. and KOHLMEYER E., 1972 - Is *Ascophyllum nodosum* lichenised? *Bot. Mar.*, 15, 109-112.

KOHLMEYER J. and KOHLMEYER E., 1979 - Marine mycology: the higher fungi. Academic Press, New-York. 541 p.

KOHLMEYER J. and VOLKMANN-KOHLMEYER B., 1991 - Illustrated key to the filamentous higher marine fungi. *Bot. Mar.*, 34, 1-61.

KOSKE R.E., FRIESE C.F., OLEXIA P.D. and HAUKE R.L., 1985 - Vesicular-arbuscular mycorrhizas in *Equisetum*. *Trans. Br. mycol. Soc.*, 85(2): 350-353.

KRASSILOV V., 1981 - Orestovia and the origin of vascular plants. *Lethaia*, 14: 235-250.

KRASSILOV V.A. and SCHUSTER R.M., 1983 - Paleozoic and mesozoic fossils. *In* New Manual of Bryology, vol. 2, R.M. Schuster ed., Hattori Bot. Lab., Nichinan, Japon. Pp. 1170-1193.

LAMBOY W.F., 1984 - Evolution of flowering plants by fungus-to-host horizontal gene transfert. *Evolutionary Theory*, 7: 45-51.

LAPEYRIE F., 1988 - Oxalate synthesis from soil bicarbonate by the ectomycorrhizal fungus *Paxillus involutus*. *Plant and Soil*, 110: 3-8.

LAPEYRIE F., 1990 - The role of ectomycorrhizal fungi in calcareous soil tolerance by "symbiocalcicole" woody plants. *Ann. Sci. For.*, 21: 579-589.

LAPEYRIE F., RANGER J. and VAIRELLES D., 1991 - Phosphate solubilizing activities of ectomycorrhizal fungi in vitro. *C. J. Bot.*, 69: 342-346.

LAWREY J.D., 1986 - Biological role of lichen substances. *Bryologist*, 89(2): 111-122.

LEAKE J.R., 1994 - The biology of myco-heterotrophic ('saprophytic') plants. *New Phytol.*, 127: 171-216.

LEMOIGNE Y., 1968 - Les genres *Rhynia* Kidston et Lang du Dévonien et *Psilotum* actuel appartiennent-ils au même phylum ? *Bull. Soc. bot. Fr.*, 115: 425-440.

LEWIS D.H., 1973 - Concepts in fungal nutrition and the origin of biotrophy. *Biol. Rev.*, 48: 261-278.

LEWIS D.H., 1987 - Evolutionnary aspects of mutualistic associations betwen fungi and photosynthetic organisms. *In* Evolutionary biology of the fungi, Rayner A.D.M., Brasier C.M. et Moore D.M. ed., Cambridge University Press, Cambridge. Pp. 161-178.

LEWIS D.H., 1991 - Mutualistic symbioses in the origin and evolution of land plants. *In* Symbiosis [redacted] a evolutionary innovation in speciation and morphogenesis, L. Margulis et R. Fester ed., Massachusetts Institute of Technology Press, Cambridge, Mass., U.S.A. Pp. 288-300.

LE TACON F. and SELOSSE M.-A., 1994 - La place des symbioses mycorhiziennes dans l'évolution et la colonisation des continents par la vie. *Act. bot. Gallica*, 141(4): 1-15.

LIGRONE R., 1988 - Ultrastructure of a fungal endophyte in *Phaeoceros laevis* (L.) Prosk. (Anthocerotophyta). *Bot. Gaz.*, 149 (1): 92-100.

LIGRONE R. and LOPES C., 1989 - Cytology and development of a mycorrhiza-like infection in the gametophyte of *Conocephalum conicum* (L.) Dum. (Marchantiales, Hepatophyta). *New Phytol.*, 111: 423-433.

LIGRONE R., POCOCK K. and DUCKETT J.G., 1993 - A comparative ultrastructural study of endophytic basidiomycetes in the parasitic achlorophyllous hepatic *Cryptothallus mirabilis* and the closely allie photosynthetic species *Aneura pinguis* (Metzgeriales). *Can. J. Bot.*, 71: 666-679.

LUTTRELL E.S., 1974 - Parasitism of fungi on vascular plants. *Mycologia*, 66: 1-15.

MALLOCH D.W., 1987 - The evolution of mycorrhizae. *Can. J. Plant Pathol.*, 9: 398-402.

MALLOCH D.W., PIROZYNSKI K.A. and RAVEN P.H., 1980 - Ecological and evolutionary significance of mycorrhizal symbioses in vascular plants (a review). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77: 2113-2118.

MANHART J.R. and PALMER J.D., 1990 - The gain of two chloroplast tRNA introns marks the green algal ancestors of land plants. *Nature*, 345: 268-270.

MARGULIS L., 1993 - Symbiosis in cell evolution. Ed. 2. Freemar, San Francisco. 452 p.

MARTIN F. and BOTTON B., 1993 - Nitrogen metabolism of ectomycorrhizal fungi and ectomycorrhiza. *In* Advances in Plant Pathology, D. S. Ingram et P. H. Williams ed., vol. 9: Mycorrhiza synthesis, I.C. Tommerup ed., Academic Press. Pp. 83-102.

MARX D.H., 1972 - Ectomycorrhizae as biological deterrents to pathogenic root infections. *Ann. Rev. Phytopathol.*, 10: 429-454.

McGEE P.A., 1985 - The leack of spread of endomycorrhizas of *Centaurium* (*Gentianaceae*). *New Phytol.*, 101: 451-458.

MISHLER B.D. and CHURCHILL S.P., 1985 - Transition to a land flora: phylogenetic relationships of the Green Algae and Bryophytes. *Cladistics*, 1(4): 305-328.

MOLLENHAUER D., 1992 -*Geosiphon pyriforme*. *In* Algae and symbiosis: plants, animals, fungi, viruses, interactions explored, Reisser W. ed., Biopress Ltd, Bristol. Pp. 339-351.

MOLLENHAUER D. and KLUGE M., 1994 - *Geosiphon pyriforme*. *Endocytobiosis & Cell Res.*, 10: 29-34.

MOSSE B., 1973 - Advances in the study of vesicular-arbuscular mycorrhiza. *An. Rev. Phytopath.*, 11:171-196.

MOUSAIN D. et SALSAC L., 1982 - Nutrition phosphatée et activités phosphatases acides des symbiotes ectomycorhiziens cultivés isolément ou en association. *In* Les mycorhizes: biologie et utilisation, S. Gianinazzi ed., INRA Paris. Pp. 87-100.

NICOLSON T.H., 1967 - Vesicular-arbuscular mycorrhiza - a universal plant symbiosis. *Sci. Prog.* (Oxford), 55: 561-581.

PARKE J.L. and LINDEMAN R.G., 1980 - Association of vesicular-arbuscular mycorrizal fungi with the moss *Funaria hygrometrica*. *Can. J. Bot.*, 58: 1898-1904.

PEARSON V. and TINKER P.B., 1975 - Measurement of phosphorus fluxes in the external hyphae of endomycorrhizas. *In* Endomycorrhizas. Ed. F. E. Sanders, B. Mosse and P.B. Tinker. Academic Press, Londres et New-York. Pp. 277-287.

PETERSON R.L., HOWARTH M.J. and WHITTIER D.P., 1981 - Interactions between a fungal endophyte and gametophyte cells in *Psilotum nudum*. *Can J. Bot.*, 59: 711-720.

PIROZYNSKI K.A., 1976 - Fossil fungi. *An. Rev. Pl. Pathol.*, 14: 237-246.

PIROZYNSKI K.A., 1981 - Interactions between fungi and plants through the ages. *Can. J. Bot.*, 59: 1824-1827.

PIROZYNSKI K.A. 1988 - Coevolution by horizontal gene transfert: a speculation on the role of fungi. *In* Coevolution of fungi with plants and animals, K.A. Pirozynski et D.L. Hawksworth ed., Academic Press, Londres. Pp. 247-268.

PIROZYNSKI K.A., 1991 - Gall, flowers, fruits and fungi. *In* Symbiosis as a evolutionary innovation in speciation and morphogenesis, L. Margulis et R. Fester ed. Massachusetts Institute of Technology Press, Cambridge, Mass. U.S.A. Pp. 364-380.

PIROZYNSKI K.A. and DALPE Y., 1989 - Geological history of the *glomaceae* with particular reference to mycorrhizal symbiosis. *Symbiosis*, 7: 1-36.

PIROZYNSKI K.A. and HAWKSWORTH D.L. 1988 - Coevolution of fungi with plants and animals: introduction and overview. *In* Coevolution of fungi with plants and animals, K.A. Pirozynski et D.L. Hawksworth ed., Academic Press, Londres. Pp. 1-30.

PIROZYNSKI K.A. and MALLOCH D.W., 1975 - The origin of land plants: a matter of mycotrophism. *Biosystems*, 6: 153-164

POCOCK K. and DUCKETT J.G., 1984 - A comparative ultrastructural analysis of the fungal endophytes in *Cryptothallus mirabilis* Malm. and other british thalloid hepatics. *J. Bryol.*, 13: 227-233.

POCOCK K. and DUCKETT J.G., 1985a - Fungi in hepatics. *Bryol. Times*, 31: 2-3.

POCOCK K. and DUCKETT J.G., 1985b - On the occurence of branched and swollen rhizoids in british hepatics: their relationships with the substratum and associations with fungi. *New Phytol.*, 99: 281-304.

POCOCK K. and DUCKETT J.G., 1985c - The alternative mycorrhizas: fungi and hepatics. *Bull. Br. Bryol. Soc.*, 45: 10-11.

POELT J. und MAYRHOFER H., 1988 - Uber Cyanotrophie bei Flechten. *Pl. Syst. Evol.*, 158: 265-281.

PRATT L.M., PHILLIPS T.L. and DENNISON J.M., 1978 - Evidence of non-vascular land plants from the early Silurian (Llandoverian) of Virginia, U.S.A. *Rev. Palaeobot. Palynol.*, 25: 121-149.

RAVEN J.A., 1977 - The evolution of vascular land plants in relation to supracellular transport processes. *Adv. Bot. Res.*, 5: 153-219.

RAVEN J.A., 1987 - Biochemistry, biophysics and physiology of chlorophyll b-containing algae: implications for taxonomy and phylogeny. *Progr. Phycol. Res.*, 5: 1-122.

READ D.J., 1983 - The biology of mycorrhiza in the Ericales. *Can. J. Bot.*, 61: 985-1004.

REMY W., TAYLOR T.N., HASS H. and KERP H., 1994 - Four-hundred-million-year-old vesicular arbuscular mycorrhizae. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91: 11841-11843.

RETTALLACK G.J., 1981 - Fossil soils: indicators of ancient terrestrial environnements. *In* Paleobotany, paleoecology and evolution, vol. 1, K.J. Niklas ed., Praeger Publisher New-York. Pp. 55-102.

SCANNERINI S. and BONFANTE-FASOLO P., 1989 - Plants and mycorrhizal fungi: coevolution or not coevolution ? *In* Endocytobiology IV, P. Nardon, V. Gianinazzi-Pearson, A.M. Grenier, L. Margulis et D.C. Smith ed., INRA Presse, Paris. Pp. 77-82.

SCHATZ S., 1980 - Taxonomic revision of two Pyrenomycetes associated with littoral-marine green algae. *Mycologia*, 72: 110-117.

SCHMID R., 1976 - Septal pores in *Prototaxites*, an enigmatic devonian plant. *Science*, 191: 287-288.

SCHMID E. and OBERWINKLER F., 1993 - Mycorrhiza-like interaction between the achlorophyllous gametophyte of *Lycopodium clavatum* L. and its fungal endophyte studied by light and electron microscopy. *New Phytol.*, 124: 69-81.

SCHÖNBECK. F. 1979 - Endomycorrhiza in relation to plant disease. *In* Soil Borne Pathogens. B. Chippers ■ W. Gams ed., Academic Press, Londres. Pp. 271-280.

SCHOPF J.W., 1970 - Precambrian micro-organisms and evolutionary events prior to the origin of vascular plants. *Biol. Rev.*, 45: 319-352.

SCHOPF J.W. and BARGHOORN E.S., 1969 - Micro-organisms from the late Precambrian of South Australia. *J. Paleontol.*, 43: 111-118.

SCHOPF J.W., FORD T.D. and BREED W.J., 1973 - Micro-organims from the late Precambrian of the Grand Canyon, Arizona. *Science*, 179: 1319-1321.

SCHUSSLER A., MOLLENHAUER D., SCHNEPF E. and KLUGE M., 1994 - *Geosiphon pyriforme*, an endosymbiotic association of fungus and cyanobacteria: the spore structure resembles that of arbuscular mycorrhizal (AM) fungi. *Bot. Acta*, 107: 36-45.

SCHUSTER R.M., 1981 - Paleoecology, origin, distribution through time and evolution of Hepaticae and Anthocerotae. *In* Paleobotany, paleoecology and evolution, vol. 2, K.J. Niklas ed., Praeger, New York. Pp. 129-191.

SHERWOOD-PIKE M.A. and GRAY J., 1985 - Silurian fungal remains: probable records of the class ascomycetes. *Lethaia*, 18: 1-20.

SIEGEL M.R., LATCH G.C.M. and JOHNSON M.C., 1987 - Fungal endophytes of grasses. *Ann. Rev. Phytopathol.*, 25: 293-315.

SIPMAN H.J.M., 1983 - A monograph of the lichen family *Megalospraceae*. *Bibliotheca Lichenologica*, 18: 1-241.

SIMON L., BOUSQUET J., LEVESQUE R.C. and LALONDE M., 1993 - Origin and diversification of endomycorrhizal fungi and coincidence with vascular plants. *Nature*, 363: 67-69.

SMITH D.C. and DOUGLAS A.E., 1987 - The biology of symbiosis. Arnold, Londres. 302 p.

STALEY J.T., PALMER F. and ADAMS J.B., 1982 - Microcolonial fungi: common inhabitants on desert rocks ? *Science*, 215: 1093-1095.

STEBBINS G.L. and HILL G.J.C., 1980 - Did multicellular plants invade the land ? *Am. Nat.*, 115: 342-353.

STUBBLEFIELD S. and TAYLOR T.N., 1988 - Recent advances in palaeomycology. *New Phytol.*, 108: 3-25.

STUBBLEFIELD S.P., TAYLOR T.N. and MILLER C.E., 1985 - Studies of paleozoic fungi IV: wall ultrastructure of fossil endogonaceous chlamydospores. *Mycologia*, 77(1): 83-96.

STUBBLEFIELD S.P., TAYLOR T.N. and TRAPPE J.M., 1987a - Vesicular-arbuscular mycorrhizae from the triassic of Antarctica. *Am. J. Bot.*, 74: 1904-1911.

STUBBLEFIELD S.P., TAYLOR T.N. and TRAPPE J.M., 1987b - Fossil mycorrhizae: a case for symbiosis. *Science*, 237: 59-60.

STUBBLEFIELD S.P., TAYLOR T.N. and SEYMOUR R.L., 1987c - A possible endogonaceous fungus from the triassic of Antarctica. *Mycologia*, 79(6): 905-906.

ST JOHN T.V., 1980 - Root size, root hairs and mycorrhizal infection: a re-examination of Baylis's hypothesis with tropical trees. *New Phytol.*, 84: 483-487.

STRULLU D.G., GOURRET J.P. [redacted] GARREC J.P., 1981 - Microanalyse des granules vacuolaires des ectomycorhizes, endomycorhizes et endomycothalles. *Physiol. Vég.*, 19: 367-378.

TABER A. and TRAPPE J.M., 1982 - Vesicular-arbuscular mycorrhiza in rhizomes, scale-like leaves, roots and xylem of ginger. *Mycologia*, 74: 156-161.

TAYLOR T.N., 1988 - The origin of land plants: some answers, more questions. *Taxon*, 37(4): 805-833.

TAYLOR T.N., 1990 - Fungal associations [redacted] the terrestrial paleoecosystem. *Trends* [redacted] *Ecology and Evolution*, 5: 21-25.

TAYLOR T.N., 1993a - Fungi. *In* The Fossil Record 2, M.J. Benton ed., Chapman [redacted] Hill, Londres. Pp. 9-13.

TAYLOR T.N., 1993b - The role of late paleozoic fungi in understanding the terrestrial paleoecosysteme. *In* Comptes-rendus XII ICC-P, vol. 2. Pp. 147-154.

TAYLOR T.N and TAYLOR E.L., 1993 - The biology and evolution of fossil plants. Prentice Hall, Englewood Cliffs (New Jersey). 982 p.

TAYLOR T.N., HASS H. and REMY W., 1992 - Devonian fungi: interactions with the green alga *Paleonitella*. *Mycologia*, 84: 901-910.

TAYLOR T.N., REMY W. and HASS H., 1992 - Parasitism in a 400-million-year-old green alga. *Nature*, 357: 493-494.

TERASHITA T. and KAWAKAMI Y., 1991 - An endomycorrhizal fungus of *Burmannia liukiuensis*. *Trans. Mycol. Soc. Jap.*, 32: 207-216.

TESTER M., SMITH S.E. and SMITH F.A., 1987 - The phenomenon of "nonmycorrhizal" plants. *Can. J. Bot.*, 65: 419-431.

TIFFNEY B.H. and BARGHOORN E.S., 1974 - The fossil record of the fungi. Occasional Papers, Farlow Herbarium Cryptogamic Botany, 7. Harvard University, Cambridge, Mass. Pp. 1-42.

TOPHAM P.B., 1977 - Colonization, growth, succession and competition. *In* Lichen ecology, M.R.D. Seawards ed., Academic Press, Londres. Pp. 31-68.

TRAPPE J.M., 1982 - Synoptic keys to the genera and species of zygomycetous mycorrhizal fungi. *Phytopathol.*, 72(8): 1102-1108.

TSCHERMAK-WOESS E., 1988 - The algal partner. *In* Handbook of lichenology, M. Galun ed., CRC Press Boca Raton. Pp. 39-92.

TYLER S.A. and BARGHOORN E.S., 1954 - Occurence of the structurally preserved plants in precambrian rocks of the canadian shield. *Science*, 119: 606-608.

VOLPIN H., ELKIND Y., OKON Y. and KAPULNIK Y., 1994 - A vesicular arbuscular mycorrhizal fungus (*Glomus intraradix*) induces a defense response in alfalfa roots. *Plant Physiol.*, 104: 683-689.

WAGNER C.A. and TAYLOR T.N., 1981 - Evidence for endomycorrhizae in pennsylvanian age plant fossils. *Science*, 212: 562-563

WAGNER C.A. and TAYLOR T.N., 1982 - Fungal chlamydospores from the Pennsylvanian of North America. *Rev. Palaeobot. Palynol.*, 37: 317-328.

WEBBER F.C., 1967 - Observations on the structure, life history and biology of *Mycosphaerella ascophylli*. *Trans. Br. mycol. Soc.*, 50 (4): 583-601.

WEIJMAN A.C. and MEUZELAAR H.L.C., 1979 - Biochemical contributions to the taxonomic status of the *Endogonaceae*. *Can. J. Bot.*, 57: 284-291.

WHITE J.F., 1987 - The widespread distribution of endophytes in the *Poaceae*. *Pl. Dis.*, 71: 340-342

WRAINRIGHT P.O., HINKLE G., SOGIN M.L. and STICKEL S.K., 1993 - Monophyletic origins of the metazoa: an evolutionary link with fungi. *Science*, 260: 340-342.

WRIGHT V.P., 1985 - The precursor environnement for vascular plant colonization. *Phil. Trans. R. Soc. Lond.*, ser. B, 309: 143-145.

IN VITRO INHIBITORY ACTIVITY OF TRICHORZIANINES ON *SCLEROTIUM ROLFSII* SACC.

A. CORREA[1], S. REBUFFAT[2], B. BODO[2], M.-F. ROQUEBERT[3], J. DUPONT[3] and L. BETTUCCI[1]

[1]Sección Micología, Facultad de Ciencias, Universidad de la República. T. Narvaja 1674, CP 11200, Montevideo, Uruguay.
[2]Laboratoire de Chimie, MNHN, Paris.
[3]Laboratoire de Cryptogamie, MNHN, Paris.

ABSTRACT - Trichorzianines A and B obtained from *Trichoderma harzianum* were tested on the mycelial growth of *Sclerotium rolfsii*. Bioassays evidenced that the trichorzianines had different inhibitory activity. These metabolites produced a change in the morphogenetic pattern of mycelia. Bioassays also showed that trichorzianines A inhibited the own mycelia of *T. harzianum*, which could be considered as an absence of immunity. Effects of trichorzianines on plasma membrane are discussed.

RÉSUMÉ - Les trichorzianines A et B obtenues à partir de cultures de *T. harzianum* ont été testées pour leur activité antagoniste sur le développement mycélien de *S. rolfsii*. Les résultats expérimentaux montrent que les deux types de trichorzianines ont des activités différentes sur la croissance et la morphogenèse mycéliennes de *S. rolfsii*. Les essais effectués mettent aussi en évidence l'absence d'auto-immunité de *T. harzianum* vis à vis de ses propres trichorzianines. L'effet probable de ces dernières sur les membranes cellulaires est discuté.

KEYWORDS - *Sclerotium rolfsii*, *Trichoderma harzianum*, growth inhibition, trichorzianines, self-inhibition.

INTRODUCTION

Several studies about antibiotic production by fungal strains and their effect on different plant pathogens were performed under laboratory conditions being *T. harzianum* one of the most active (Fravel, 1988; Ghisalberti *et al.*, 1990; Scarselletti & Faull, 1994). However, very little is known about the antibiotic activity of *T. harzianum* on mycelial growth of the important soilborne plant pathogen *Sclerotium rolfsii* (Bell *et al.*, 1982). Three categories of antibiotics produced by *T. harzianum* (and other *Trichoderma* species) can be recognized: "volatiles", e.g. 6-pentyl-α-pyrone [6-p-p] and most of the isocyanide class of compounds; "leachables", materials with some solubility in water and "peptaibols", which consist of hydrophobic peptides (Ghisalberti & Sivasithamparam, 1991). These last compounds are peptides with 7 to 20 aminoacid residues, containing a high proportion of α-aminoisobutyric acid, with acetylated N-terminal and C-terminal aminoalcohol (Bodo *et al.*, 1985; El Hajji *et al.*, 1987, 1989).

Trichorzianines are a mixture of molecules of the peptaibol class produced by *T. harzianum* which, interact with lipid membranes and modify their permeability (El Hajji *et al.*, 1989).

TA are linear neutral monodecapeptide with an acetyleted N terminal residue and a C terminal amino alcohol. TB are the acidic anlogues due to the replacement of a glutamine at position 18 in the sequence by a glutamic acid.

The aim of this work was to evidence a causal link between trichorzianines produced by *T. harzianum* and their *in vitro* inhibitory activity on the mycelial growth of *S. rolfsii* as well as on the *T. harzianum* mycelium itself.

MATERIALS AND METHODS

Fungal strains

Trichoderma harzianum Rifai (MVHC 6063) was used for production of trichorzianines and *Sclerotium rolfsii* Sacc. (MVHC 5407) was the plant pathogen used in this study. Each fungus was subcultured on 2% malt-agar (MA) and grown at 24°C in the dark and the strains were preserved on 2% MA slopes at 5°C.

Extraction of trichorzianines

Fungal cultures were performed by inoculating 200 ml of synthetic media with 1 ml of spores suspension in 1 l Roux flasks. The synthetic medium was composed of: 5 g glucose; 0.8 g KH_2PO_4; 0.7 g KNO_3; 0.2 g $CaHPO_4$; 0.5 g $MgSO_4$; 10 mg $MnSO_4$; 10 mg $ZnSO_4$; 5 mg $CuSO_4$; 1 mg $FeSO_4$; in 1 l distilled water pH 6. Sixty flasks of stationary culture were incubated at 24°C until sporulation. Extraction of trichorzianines was performed according to the method proposed by Rebuffat *et al.* (1991).

Each liquid culture of *T. harzianum* was filtered in a Büchner funnel to separate mycelium from culture broth. Wet mycelium was extracted three times with methanol at room temperature and the extracts combined and evaporated to dryness. The filtered broth was extracted three times with n-butanol, the extracts were then combined and evaporated to dryness. Both mycelial and broth extracts were treated with hexane using the same procedure as for methanol or n-butanol. The insoluble broth fraction obtained was initially fractionated by Sephadex LH-20 chromatography (MeOH), then on silica-gel column (SiO_2, Merck; CH_2Cl_2/MeOH 80:20-50:50). Thin-layer chromatograms (TLC) were performed on all kinds of extracts using a SiO_2 plate (Polygram Sil G/UV); CH_2Cl_2/MeOH 80:20, and visualized by spraying with anisaldehyde/H_2SO_4/acetic acid (1:0.5:25) reagent or H_2SO_4 10% (v/v). Trichorzianines yet obtained by the co-authors were used as control for the TLC.

Bioassays

The different fractions obtained were tested for their antagonistic activity against the mycelial growth of *S. rolfsii*. A methanol solution of each fraction was

mixed with 2% liquid MA (45-50°C) and 2.5 ml were poured in small Petri dishes (5 cm diameter), which were then inoculated with a fresh sclerotium (14 days old) and incubated at 24°C. The inhibitory activity of the peptide mixture was tested with 25, 50 and 100 $\mu g.ml^{-1}$ of MA medium and, the trichorzianines A and B at 100 $\mu g.ml^{-1}$. Four sets of concentrations with 0, 2, 4 and 10 $\mu l.ml^{-1}$ of methanol in 2% MA were prepared as controls to evaluate the incidence of methanol on mycelial growth. Treatments and controls were replicated five times. The diameter of the *S. rolfsii* colonies was measured and the percentages inhibition of growth was calculated from mean values at 72 h as follows: 100-(dt.100/DT), where dt is the diameter of the treated colony and DT is the diameter of the control. Differences between the inhibitory activity of each *T. harzianum* extract on the *S. rolfsii* mycelium were evidenced by means of ANOVA (Service des Etudes Statistiques, Institut Technique des Céréales et des Fourrages, France, STAT-ITCF). Mycelial growth was observed until 12 days.

The activity of trichorzianines A on mycelial growth of *T.harzianum* was tested and dry weigth of mycelium was calculated. The inhibitory activity was calculated as previously described for *S. rolfsii*.

RESULTS

The soluble hexane fraction from *T. harzianum* mycelia and broth had not affected the mycelial growth of *S. rolfsii* as well as insoluble hexane fraction extracted from mycelium (P>95%). Conversely, the insoluble hexane fraction extracted from broth inhibited the mycelial growth. When this extract was fractionated on Sephadex LH 20 a peptide mixture was obtained. The activity of this fraction showed that the inhibitory activity increased up to 80% at a concentration of 100 $\mu g.ml^{-1}$ (P>99%, Plate 1). The peptide mixture fractionated on silica gel resulted in two groups of trichorzianines termed A (TA) and B (TB). TA inhibited 70% (P>99%) and TB 36% (P>95%) of the *Sclerotium* mycelial growth (Table 1).

Table 1. Inhibition of *S. rolfsii* mycelial growth after 72 hours (in percent, GI%) by mycelium, mixture and different peptides fractions. Values follow by a differ at probability (P)>95%, *b* at P>99% as determined by ANOVA and *c* do not differ.

Tableau 1. Activité inhibitrice du mycelium, du mélange et des différentes fractions peptidiques sur la croissance de *S. rolfsii* après 72 heures de culture (en % par rapport au témoin). Les valeurs suivies de *a* diffèrent avec une probabilité (P)> à 95%, *b*> 99% et *c* n'est pas différente du témoin.

Products	Concentration of products ($\mu g.ml^{-1}$)	GI%
Mycelium fraction	$2x10^3$	-9 *a*
Mixture of peptides:	25	11 *c*
	50	56 *a*
	100	80 *b*
Trichorzianines A	100	70 *b*
Trichorzianines B	100	36 *a*

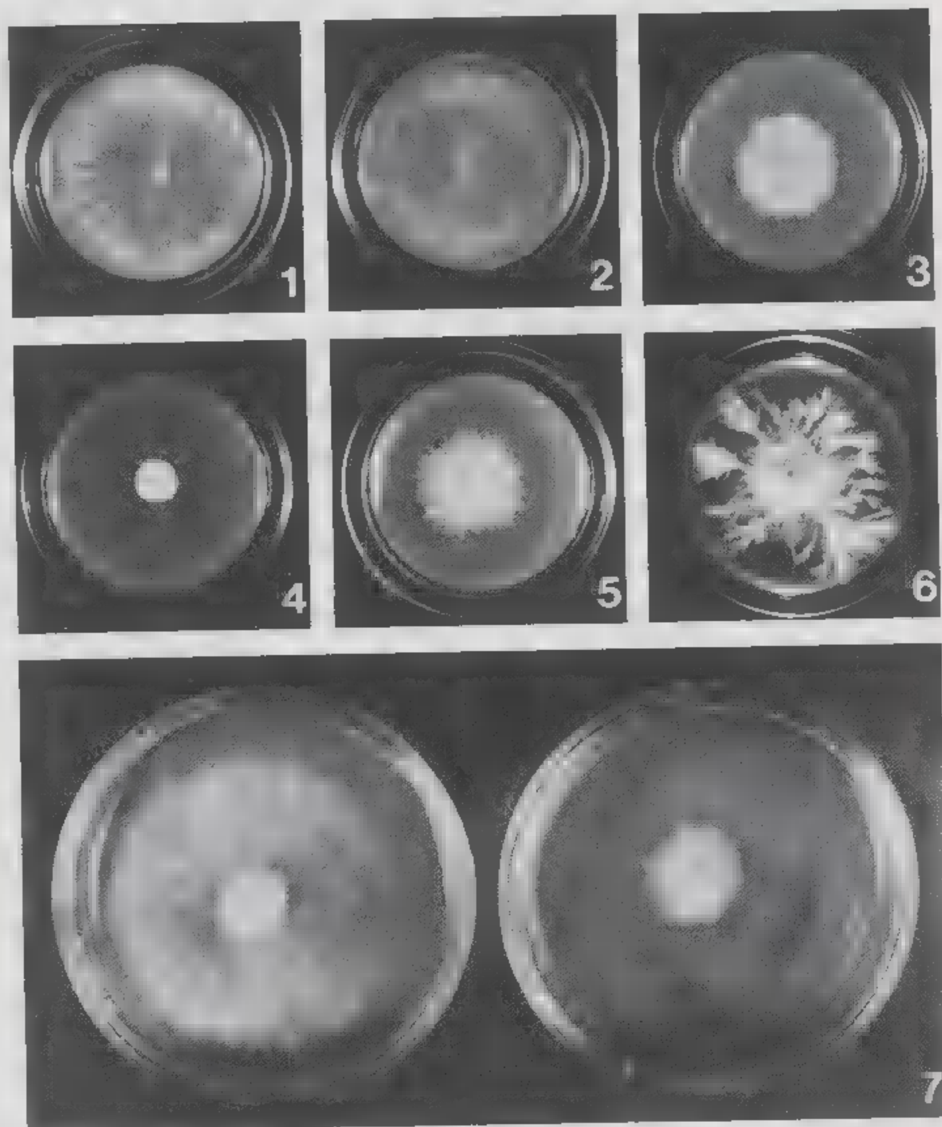


Plate 1. Peptide growth inhibition of *S. rolfsii* after 96 hours. 1: *S. rolfsii* control growing on MA medium; 2-4: mixture of peptides at different concentrations (25, 50, 100 $\mu g.ml^{-1}$). 5: Effect of low molecular weight fraction. 6: Effect of peptide mixture (100 $\mu g.ml^{-1}$) on growth pattern of *S. rolfsii* after 10 days. Strands of mycelium [redacted] opening up in [redacted] fanlike fashion. 7: Trichorzianines A growth inhibition of *S. rolfsii* after 96 hours. Left: *S. rolfsii* control growing on MA medium; right: with TA (100 $\mu g.ml^{-1}$).

Growth was limited but never completely stoped and after 10 days the mixture of peptides induced change of growth pattern of *S. rolfsii* at 100 μg.ml^{-1}. Strands of aerial mycelium grew out, opening up the growth front of the colony in ■ fanlike fashion. At 25 and 50 μg.ml^{-1}, the colonies were similar to the control. On the other hand, trichorzianines A isolated from *T. harzianum* inhibited 65% of the mycelial growth of the same strain. In this case colonies were restricted but more dense than the control therefore the dry weigth was evaluated. Results showed reduction to 58% dry weigth in relation to the control.

DISCUSSION

Results showed that when trichorzianines were present in the culture media the mycelial growth of *S. rolfsii* was noticeably reduced. Moreover, at higher concentration, higher inhibition was evidenced. It has been shown previously that trichorzianines increase the permeability of synthetic lipid membranes and also cause the lysis of the *D. discoideum* amoeba (El Hajji *et al.*, 1989). Other peptidic antibiotics produced by *Trichoderma* species have shown that they act with a similar mechanism (Ramesh *et al.*, 1977). Thus, trichorzianines could have probably induced disruptions in the plasma membrane of *Sclerotium*.

Trichoderma metabolites not only affected mycelial rate ofgrowth of *S. rolfsii* but also produced ■ change in the normal morphogenetic pattern. At the highest trichorzianines concentration, the mycelium was aggregated after 10 days and grew upwards. Peptide activity was fungistatic but not fungicidic.

The differences in the inhibitory activity of TA, which is higher than TB's, could be related to the neutral property of the former and the acidic character of the latter (EL Hajji *et al.* 1987). The interaction of the peptide TB with the lipid membrane could be prevented by its acidic property (El Hajji *et al.*, 1989). The mycelial growth inhibition of *T. harzianum* by the TA seems to indicate an absence of immunity of the mycelium towards its own antibiotic metabolites contrary to the autoimmunity observed for the microcin peptide antibiotics produced by some Enterobacteriaceae (Baquero & Moreno, 1984; Gaggero *et al.*, 1993). It is assumed that in filamentous fungi the distribution of primary and secondary metabolism is separated in space and time (Moss, 1984; Griffin, 1994). In nature, metabolites such as trichorzianines are probably produced by more differenciated parts of the mycelium. They do not necessarily act on hyphal tips where growth occur. In our experiments TA was present all over the medium and by the way inhibited the growth.

Planche 1. Effet inhibiteur du mélange de peptides sur la croissance de *S. rolfsii* après 96 heures. 1: *S. rolfsii* témoin sur milieu MA; 2-4: avec mélange de peptides à diverses concentrations (25, 50, 100 μg.ml^{-1}); 5: avec la fraction à bas poids moléculaire; 6: avec le mélange de peptides après 10 jours de culture. Les cordons mycéliens se dressent en forme d'éventail. 7: Inhibition de la croissance de *S. rolfsii* par la trichorzianine A (100 μg.ml^{-1}) après 96 heures. Témoin à gauche.

We are very grateful to M. Massias (Laboratoire de Chimie, MNHN, Paris) M. Dumont (Laboratoire de Cryptogamie, MNHN, Paris) for their technical assistance.
This research has been supported by the Scientific and Technical Uruguayan-French Cooperation.

BIBLIOGRAPHY

BAQUERO F. and MORENO F., 1984. The microcins. *FEMS Microbiology Letters* 23: 117-124.

BELL, D. K., WELLS, H. D. and MARHAM, C. R., 1982. *In vitro* antagonism by *Trichoderma* species against six fungal pathogens. *Phytopath.* 72: 379-382.

BODO, B., REBUFFAT, S., EL HAJJI, M. and DAVOUST, D., 1985 - Structure of trichoarzianines A IIIc, an antifungal peptide from *Trichoderma harzianum*. *J. Am. Chem. Soc.* 107: 6011-6017.

EL HAJJI, M., REBUFFAT, S., LECOMMANDEUR, D. and BODO, B., 1987. Isolation and sequence determination of trichoharzianines a antifungal peptides from *Trichoderma harzianum*. *International J. Pept. Protein Res.* 29: 207-215.

EL HAJJI, M., REBUFFAT, S., LE DOAN, T., KLEIN, G., SATRE,M. and BODO, B., 1989. Interaction of trichorzianines A and B with model membranes and with the amoeba *Dictyostelium*. *Biochim. Biophys. Acta* 978: 97-104.

FRAVEL, D.R., 1988. Role of antibiosis in the biocontrol of plant diseases. *Ann. Rev.of Phytopath.* 26: 75-91.

GAGGERO, C., MORENO, F. and LAVIÑA, M., 1993. Genetic analysis of microcin H47 antibiotic system. *J. Bacteriol.* 175: 5420-5427.

GHISALBERTI, E. L., NARBEY, M. J., DEWAN, M. M. and SIVASITHAMPARAM, K., 1990. Variability among strains of *Trichoderma harzianum* in their ability to reduce take-all and to produce pyrones. *Plant and Soil* 121: 287-291.

GHISALBERTI, E. L. and SIVASITHAMPARAM, K., 1991. Antifungal antibiotics produced by *Trichoderma* spp. *Soil Biol. Biochem.* 23: 1011-1020.

GRIFIIN, D. H., 1994. *Fungal physiology* (ed. D. H. Griffin). John Wiley & Sonsn, Inc., Publication New York, U.S.A. pp. 323-342. Cambridge University Press:Cambridge, UK.

MOOS, M. O., 1984. The mycelial habit and secondary metabolite production. In: *The ecology and physiology of the fungal mycelium* (ed. D. H. Jennings & A. D. M. Rayner), pp. 127-142 Cambridge University Press: Cambridge, U.K.

RAMESH, C. P., COOK, J. C., and RINEHART, K. L., 1977. High resolution and field desorption mass spectrometry studies and revised structures of Alamethicins I and II1,2. *J. Amer. Chem. Soc.* 99: 8469-8482.

REBUFFAT, S., PRIGENT, Y., AUVIN-GUETTE, C. and BODO, B., 1991. Tricholongins BI and BII, 19-residue peptaibols from *Trichoderma longibrachiatum*. *FEBS Eur. J. Biochem.* 201 661-674.

SCARSELLETTI, R. and FAULL, J. L., 1994. In vitro activity of 6-pentyl-α-pyrone, a metabolite of *Trichoderma harzianum*, ■ the inhibition of *Rhizoctonia solani* and *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici*. *Mycol. Res.* 98: 1207-1209.

Cryptogamie, Mycol. 1995, 16 (3): 191-194

ENHANCED SECRETION OF ELICITINS BY *PHYTOPHTHORA* FUNGI EXPOSED TO PHOSPHONATE

Valérie PEREZ[1], Ali M. MAMDOUH[2], Jean-Claude HUET[1], Jean-Claude PERNOLLET[1] and Gilbert BOMPEIX[2] *

[1]Laboratoire d'Etude des Protéines, Département de Physiologie et Biochimie végétales, INRA Versailles, Route de St Cyr, F-78026 Versailles Cedex.
[2]Laboratoire de Biochimie et Pathologie Végétales, Université Paris VI, 4 place Jussieu, C155, F-75230 Paris Cedex 05.

ABSTRACT - Even though the phosphonate ion drastically reduced the mycelium growth of *Phytophthora cryptogea* and *P. capsici*, it increased considerably the secretion of elicitins (protein elicitors). The enhanced elicitin production, caused by phosphonate, would contribute in activating the plant defences against the fungal aggression.

RÉSUMÉ - La présence de phosphonate provoque une réduction de la croissance du mycélium de *Phytophthora cryptogea* et *P. capsici* et [redacted] augmentation considérable de la secrétion d'élicitines (éliciteurs de nature protéique). Cette production accrue d'élicitines, due au phosphonate, pourrait contribuer à l'activation des mécanismes de défense des plantes contre les attaques fongiques.

MOTS CLÉS: *Phytophthora*, éliciteurs protéiques, phosphonate.

INTRODUCTION

The phosphonate ion (H_2PO_3-), is active against many genera of Oomycetes such as *Phytophthora*, fungal genus represented by numerous species parasitizing diverse types of economically important crops. Phosphonate has a direct inhibitory effect on fungal growth (Bompeix & Saindrenan, 1984; Fenn & Coffey , 1984, 1985; Smillie *et al.*, 1988; Bompeix, 1989; Griffith *et al.*, 1989). It also alters drastically the metabolism of the pathogen, resulting in stimulation of the plant defence mechanisms (Bompeix *et al.*, 1985; Guest, 1986; Saindrenan & Bompeix, 1986; Saindrenan *et al.*, 1988; Guest *et al.*,1989; Dunstan *et al.*, 1990; Nemestothy & Guest, 1990; Ali *et al.*, 1993). The combined effect of pathogen inhibition and of plant defence induction are due to the phosphonate, which finally provides effective and durable control of plant diseases (Guest & Bompeix, 1990). The latter effect involves the potential role of elicitors. It has in fact been shown that phosphonate is responsible for [redacted] significant increase in elicitor glycoconjugates produced by *Phytophthora capsici* (Rouhier *et al.*, 1993).

---

* Author to whom correspondence should be addressed.

Except *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae*, all the phytopathogenic *Phytophthora* fungi species, so far studied, secrete large amounts of holoprotein elicitors called elicitins (Pernollet *et al.*, 1993). Elicitins from different species of *Phytophthora*, when applied to tobacco, at equal doses, exhibit different levels of toxicity, but induce protection at the same level (Ricci *et al.*, 1989). They are also toxic to diverse plants other than tobacco (Pernollet *et al.*, 1993; Kamoun *et al.*, 1993; Huet *et al.*, 1994)). Elicitins offer the possibility of precise quantitation in culture filtrates. During the *P. cryptogea* growth, in absence of phosphonate, the amount of secreted elicitin was found to be proportional to the weight of mycelium (Tercé-Laforgue *et al.*, 1992)). We therefore undertook the comparison of the elicitin secretion in presence of phosphonate, using 2 different *Phytophthora* species, *P. cryptogea*, which mainly secretes cryptogein and *P. capsici*, which secretes capsicein.

EXPERIMENTAL

P. cryptogea (isolate 52 from the culture collection of Antibes INRA station and *P. capsici* (isolate 147) were grown in petri dishes, in a standard liquid medium containing asparagine (2g L-1) as the only nitrogen source (Pernollet *et al.*, 1993) or in this medium complemented with phosphonate (3 mM). Studies were conducted in five replicates at 25°C in darkness. Filtrates (20 ml) and mycelia from the 5th and the 16th days were separated by filtration on 0.45 µm filters (Millipore HV type). Mycelia were carefully washed with pure water, dessicated for 24 h before being weighed. The elicitin content of the filtrate was determined from the value of the peak height with reference to purified elicitin calibration after analytical reverse-phase high performance liquid chromatography, as already described (Tercé-Laforgue *et al.*,1992).

RESULTS AND DISCUSSION

Table 1 shows the comparison of the excretion of cryptogein and capsicein in presence and absence of phosphonate. In the absence of phosphonate, the amount of secreted elicitins were proportional to the mycelium growth (data not shown), as already observed in case of *P. cryptogea* (Tercé-Laforgue *et al.*, 1992), and the amount secreted by *P. capsici* was about twice that produced by *P. cryptogea*. Addition of phosphonate to the medium increased its yield by a factor of 8 for cryptogein and 5.5 for capsicein (16th day).

From these experiments we conclude that not only the phosphonate ion affects considerably fungal growth, but that it also causes a drastic increase of the elicitin secretion and/or leakage. Enhanced amount of elicitins, which effectively activates the plant defences (Ricci *et al.*, 1989), would contribute to strengthening the host plant defence against fungal attack. As per our knowledge, this is the first biochemically characterized plant elicitor induced by phosphonate treatment. Since in all earlier instances elicitors were characterized only indirectly. Phosphonate is likely to be a

Phytophthora capsici				
Time (day)	Mycelium: mg dry wt		Capsicein (µg.mg-1 mycelium dry wt)	
	Control	$H_2PO_3^-$	Control	$H_2PO_3^-$
5	205,6 a	67,6a	5,1a	10,5a
16	359,2b	33,4b*	4,3a	25,7b
Phytophthora cryptogea				
Time (day)	Mycelium: mg dry wt		Cryptogein (µg.mg-1 mycelium dry wt)	
	Control	$H_2PO_3^-$	Control	$H_2PO_3^-$
5	210,2a	7,6a	3,0a	24,2a
16	414,4b	27,4b	1,8a	14,4a

TABLE 1: Mycelium growth and elicitin production in the culture medium in absence and presence of phosphonate (mean of five replicates). * : partial autolysis.
Values with the same letter (within a column) are not significantly different according to Duncanis Multiple Range Test (P= 0,05).

useful tool in order to study the regulation of the elicitin expression at the molecular level in future experiments.

ACKNOWLEDGEMENTS - The authors are grateful to Michael O'Donohue for his kind help in preparing this manuscript and to Mauricette Sallé-Toume for her skilled technical assistance.

BIBLIOGRAPHY

ALI M. K., LEPOIVRE P. and SEMAL J., 1993 - Scoparone eliciting activity released by phosphonic acid treatment of *Phytophthora citrophthora* mycelia mimics the incompatible response of phosphonic acid-treated *Citrus* leaves inoculated with this fungus. *Plant Sci.* 93: 55-61.

BOMPEIX G. and SAINDRENAN P., 1984 - *In vitro* antifungal activity of fosetyl-Al and phosphorous acid on *Phytophthora* species. *Fruits* 39: 777-786.

BOMPEIX G., RAVISE A. et SAINDRENAN P., 1985 - Comportement des fongicides au niveau des relations hôte-parasite. *In* Fungicides for crop protection, B.C.P.C. Monograph, 31: 107-118.

BOMPEIX G., 1989 - Fongicides et relations plantes-parasites: cas des phosphonates. *Compt. Rend. Acad. Agric. Fr.* 75: 183-189.

DUNSTAN R.H., SMILLIE R.H. and GRANT B.R., 1990 - The effects of sub-toxic levels of phosphonate on the metabolism and potential virulence factors of *Phytophthora palmivora*. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 36: 205-220.

FENN M.E. and COFFEY M.D., 1984 -Studies on the in vitro antifungal activity of fosetyl-Al and phosphorous acid. *Phytopathology* 75: 606-611.

FENN M.E. and COFFEY M.D., 1985 - Further evidence for the direct mode of action of fosetyl-Al and phosphorous acid. *Phytopathology* 75: 1064-1068.

GRIFFITH J.M., AKINS L.A. and GRANT B.R., 1989 - Properties of the phosphate and phosphite transport systems of *Phytophthora palmivora*. *Arch. Microbiol.* 152: 430-436.

GUEST D.I., 1986 - Evidence from light microscopy of living tissues that fosetyl-Al modifies the defence response in tobacco seedlings following inoculation with *Phytophthora nicotianae* var. *nicotianae*. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 29: 251-261.

GUEST D.I., UPTON J.C.R. and ROWAN K.S., 1989 - Fosetyl-Al alters the respiratory response in *Phytophthora nicotianae* var. *nicotianae* - infected tobacco. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 34: 257-265.

GUEST D.I. and BOMPEIX G., 1990 - The complex mode of action of phosphonates. *Austral. Plant Pathol.* 19: 113-115.

HUET J.C. , SALLÉ-TOURNE M. and PERNOLLET J.C., 1994 - Amino acid sequence and toxicity of the a elicitin co-secreted with ubiquitin by *Phytophthora infestans*. *Mol. Plant Microb. Interact.* 7: 302-304.

KAMOUN S., YOUNG M., GLASCOCK C.B., and TYLER B.M., 1993 - Extracellular protein elicitors from *Phytophthora*: Host specificity and induction of resistance to bacterial and fungal phytopathogens. *Mol. Plant Microb. Interact.* 6: 15-25.

NEMESTOTHY G.S. and GUEST D.I., 1990 - Phytoalexin accumulation, phenylalanine ammonia lyase activity and ethylene biosynthesis in fosetyl-Al treated resistant and susceptible tobacco cultivars infected with *Phytophthora nicotianae* var. *nicotianae*. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 37:207-219.

PERNOLLET J.C., SALLANTIN M., SALLÉ-TOURNE M. and HUET J.C., 1993 - Elicitin isoforms from seven *Phytophthora* species: comparison of their physico-chemical and toxic properties to tobacco and other plant species. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 42: 53-67.

RICCI P., BONNET P., HUET J.C., SALLANTIN M., BEAUVAIS-CANTE F., BRUNETEAU M. and PERNOLLET J.C., 1989 - Structure and activity of proteins from pathogenic fungi *Phytophthora* eliciting necrosis and acquired resistance in tobacco. *Eur. J. Biochem.* 183: 555-563.

ROUHIER P., BRUNETEAU M., PIVOT V., BOMPEIX G. and MICHEL G., 1993 - Effect of phosphonate on the composition of the mycelial wall *Phytophthora capsici*. *Phytochemistry* 32: 1407-1410.

SAINDRENAN P. et BOMPEIXG., 1986 - Rôle des phytoalexines dans la réponse de *Vigna unguiculata* traité par le phosétyl-Al à l'infection par *Phytophthora cryptogea*. *Compt. Rend. Acad. Sci.*, série III 303: 1407-1410.

SAINDRENAN P., BARCHIETTO T., AVELINO J. and BOMPEIX G., 1988 - Effects of phosphite on phytoalexin accumulation in leaves of cowpea with *Phytophthora cryptogea*. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 32:425-435.

SMILLIE R., GRANT B. and GUEST D.I., 1988 - The mode of action of the fungicide phosphite: evidence for both direct and indirect modes of action in plants. *Phytopathology* 79: 921-926.

TERCÉ-LAFORGUE T., HUET J.C. and PERNOLLET J.C., 1992 - Movement of elicitins, necrosis-inducing proteins secreted by *Phytophthora* sp. in tobacco. *Planta* 187: 163-170.

OCHRATOXINES ET CONSÉQUENCES EN TOXICOLOGIE

E.E. CREPPY*, I. BAUDRIMONT et A.M. BETBEDER

Laboratoire de Toxicologie et d'Hygiène Appliquée.
Université de Bordeaux II, 3 ter Place de la Victoire 33000 Bordeaux

RÉSUMÉ - L'ochratoxine A (OTA) est une mycotoxine produite par des moisissures des genres *Aspergillus* et *Penicillium*. C'est un contaminant alimentaire retrouvé essentiellement dans les céréales (blé, maïs, seigle, orge), mais aussi dans les abats et les viandes d'animaux nourris avec des aliments contaminés, ainsi que dans le café, le cacao, les haricots et les fruits secs. Après avoir éliminé toutes les causes possibles l'OTA est maintenant considérée comme l'agent causal principal de la néphropathie endémique des Balkans (NEB) qui sévit dans les zones rurales des Balkans, (Bulgarie, Croatie, Slovénie, Bosnie, Roumanie). Il s'agit d'une tubulonéphrite interstitielle d'évolution lente, très souvent associée à des tumeurs du tractus urinaire. En plus de la néphrotoxicité et de la cancérogénicité, l'OTA est immunosuppressive, génotoxique, et tératogène, elle perturbe également le métabolisme glucidique et la coagulation sanguine. L'OTA est métabolisée in vitro et in vivo par plusieurs sous-familles de cytochromes P-450 en plusieurs métabolites dont le [4R]-4-hydroxyochratoxine A qui présente une cytotoxicité analogue à celle de l'OTA et se montre aussi immunosuppressive in vivo. L'OTA doit son importance actuelle sur le plan de la santé publique et sur le plan économique à son implication dans la NEB, et aussi au fait qu'elle a été retrouvée dans le sang de personnes vivant en Allemagne et dans d'autres pays d'Europe, en France, en Scandinavie, au Canada, au Japon et en Afrique du Nord. La toxicité aiguë et la toxicité chronique de l'OTA sont liées directement ou indirectement à sa propriété d'inhiber la synthèse des protéines par compétition avec la phénylalanine dans les réactions catalysées par la phénylalanyl-tRNA synthétase. Les effets cytotoxiques des ochratoxines sont aussi en partie liés aux processus oxydatifs, à la mobilisation du calcium intracellulaire, à l'inhibition de la respiration mitochondriale et à l'inhibition de la synthèse d'ATP. A cause de la difficulté à corréler les effets potentiels de l'OTA avec sa présence dans le sang humain, tous les effets observés expérimentalement chez l'animal n'ont pas encore pu être mis en evidence chez l'homme. Mais les effets toxiques les plus à craindre sont la néphrotoxicité, la tératogenèse et la cancérogenèse.

MOTS-CLÉS - Mycotoxines, aliments, ochratoxines, néphropathie endémique des Balkans, génotoxicité, cancérogénicité.

INTRODUCTION

De très nombreuses espèces fongiques produisent, dans les conditions de température et d'humidité optimales, des substances qui présentent de multiples activités. Parmi ces substances, les mycotoxines dont les effets toxiques sur l'Homme et les animaux sont connus, démontrés ou fortement suspectés, sont produites par cinq genres

* Pour les correspondances.

majeurs de moisissures: *Aspergillus, Penicillium, Fusarium, Alternaria* et *Claviceps*, en plus du genre *Gibberella* qui produit une mycotoxine dont un métabolite a été autrefois utilisé comme anabolisant du bétail, (Van der Merwe *et al.*, 1965a, b; Scott *et al.*, 1972; Krogh, 1987; Steyn, 1993).

Ces mycotoxines sont regroupées dans quelques grandes familles plus ou moins homogènes sur le plan structural: aflatoxines, trichothécènes, ochratoxines, fumonisines, ergotoxines, citréoviridines et mycotoxines trémorgéniques.

Parmi les maladies humaines ou animales liées à la présence de ces mycotoxines dans les aliments d'origine végétale, les hépatocarcinomes, l'aleucie toxique alimentaire, la néphropathie endémique des Balkans et l'encéphalomalacie équine respectivement en relation avec les aflatoxines, les trichothécènes, les ochratoxines et les fumonisines sont les plus connues et surtout les plus redoutées actuellement. Malgré de très nombreux travaux depuis les années 60, la pathogénie et l'épidémiologie des maladies liées aux mycotoxines comportent encore quelques points à élucider. Les problèmes posés par les mycotoxicoses à la santé publique dans le monde (plus dans les pays pauvres que dans les pays riches) sont probablement plus graves que ce qui est globalement perçu. En effet, en plus des effets toxiques chroniques généraux, de nombreuses mycotoxines sont génotoxiques, mutagènes, et/ou cancérogènes, IARC 1982, 1993, IPCS 1990.

L'ochratoxine A (OTA) est une mycotoxine produite par des moisissures des genres *Aspergillus* et *Penicillium* (van der Merwe *et al.*, 1965a, b). Elle est retrouvée essentiellement dans les céréales (blé, maïs, seigle, orge), mais aussi dans les abats et les viandes d'animaux nourris avec des aliments contaminés, ainsi que dans le café, le cacao, les haricots et les fruits secs etc. (Krogh, 1977, 1987).

L'importance de l'OTA sur le plan de la santé publique et sur le plan économique va grandissant à cause de son implication dans la Néphropathie Endémique des Balkans, (NEB) une tubulonéphrite interstitielle chronique souvent associée au stade terminal à des tumeurs pelviennes urétrales et vésicales, (Krogh, 1974; Chernozemsky *et al.*, 1977; Petkova-Bocharova *et al.*, 1988) et depuis qu'elle a été retrouvée dans le sang de personnes vivant en Allemagne et dans d'autres pays d'Europe, en Scandinavie, au Canada et au Japon (Bauer & Gareis, 1987; Kuiper-Goodman & Scott, 1989; Breitholtz *et al.*, 1991; Creppy *et al.*, 1993; Kawamura *et al.*, 1993).

Le pourcentage du nombre de personnes OTA positives est d'environ 22% en France contre 40 à 60% dans d'autres pays d'Europe et les taux sériques chez l'homme sont en moyenne légèrement inférieurs en France, (Creppy *et al.*, 1993) à ceux qui ont été trouvés dans les pays d'Europe du Nord et dans les Balkans. Cela démontre que le problème de l'ochratoxicose animale et humaine n'est pas circonscrit aux pays balkaniques, mais concerne tous les pays d'Europe.

Nos résultats obtenus en Tunisie et en Algérie, (Achour *et al.*, 1993; Bacha *et al.*, 1993; Khalef *et al.*, 1993) concernant l'ochratoxicose humaine et animale montrent que la contamination par l'OTA concerne le monde entier.

En plus de la néphrotoxicité et de la cancérogénicité, l'OTA est immunosuppressive, (Haubeck *et al.*, 1981; Prior & Sisodia, 1982; Creppy *et al.*, 1982, 1983a; Dwivedi & Burns, 1984; Holmberg *et al.*, 1988; Lea *et al.*, 1989; Wiger & Størmer 1990; Størmer & Lea 1995) génotoxique, (Creppy *et al.*, 1985; Pfohl-Leszkowicz *et al.*,

1991, 1993a, b, c) et tératogène, (Hayes *et al.*, 1974; Gilani *et al.*, 1978; Arora & Frölen, 1981; Mayura *et al.*, 1984, 1989), elle perturbe également le métabolisme glucidique (Suzuki & Satoh, 1973) et la coagulation sanguine (Galtier *et al.*, 1979; Gupta *et al.*, 1979; Pohland *et al.*, 1992; Størmer, 1992).

L'OTA se lie aux protéines sanguines. Elle est métabolisée in vitro et in vivo par plusieurs sous-familles de cytochromes P-450 en plusieurs métabolites dont le [4R]-4-hydroxyochratoxine A (Størmer *et al.*, 1981; Ueno, 1985; Chakor *et al.*, 1988; Castegnaro *et al.*, 1989; Hennig *et al.*, 1991; Størmer, 1992; Fink-Gremmels *et al.*, 1993), qui présente une cytotoxicité analogue à celle de l'OTA (Creppy *et al.*, 1983b) et se montre aussi immunosuppressive in vivo (Creppy *et al.*, 1983a).

Le problème de la toxicité de l'ochratoxine A (OTA), qui contamine la chaîne alimentaire de l'homme et des animaux devient de plus en plus complexe depuis que des analogues naturels toxiques de l'OTA ont été découverts (Hadidane *et al.*, 1992) et que l'ochratoxine alpha considérée comme non toxique s'est révélée génotoxique (Föllmann *et al.*, 1995).

La présence de l'ochratoxine A dans l'alimentation et le sang des personnes en France, en Europe et ailleurs dans le monde, sans pathologie directement associée contrairement à ce qui se passe dans les Balkans, soulève plusieurs questions - quelles sont les conséquences réelles de l'ochratoxicose chez l'homme? - allons nous assister à une augmentation des cas de néphropathie et de tumeurs du tractus urinaire en relation avec l'ochratoxine ailleurs que dans les Balkans?

A la lumière des résultats obtenus sur le terrain et en laboratoire, les auteurs s'efforceront d'indiquer les conséquences prévisibles de l'exposition prolongée à l'ochratoxine A.

I - ORIGINE ET PRODUCTION

L'ochratoxine A (OTA) a été isolée pour la première fois en Afrique du Sud dans des cultures d'*Aspergillus ochraceus*, au cours d'un "screening" à la recherche d'antibiotique (van der Merwe *et al.*, 1965). En laboratoire, de nombreuses moisissures cultivées en milieu liquide ou solide ont produit de l'OTA. Ce sont tout d'abord différentes souches d'*Aspergillus*, (Tableau 1a). La souche *Aspergillus ochraceus* n° NRRL 3174 cultivée en milieu liquide ou solide est capable de produire des analogues naturels de l'OTA dans lesquels la phénylalanine est remplacée par un autre acide aminé. Plusieurs de ces analogues ont déjà été isolés et identifiés (Hadidane *et al.*, 1992). Ils présentent une cytotoxicité variable en fonction de l'acide aminé dont ils dérivent. (Creppy *et al.*, 1983c). Des souches de *Penicillium* (dont *Penicillium verrucosum*) sont également capables de produire de l'OTA dans des conditions de température qui se retrouvent dans les pays tempérés du nord, (Deutsche Forschungsgemeinschaft 1990) (Tableau 1b).

La production de l'OTA et des analogues dépend essentiellement de deux facteurs, l'humidité ambiante et la teneur en eau du support solide d'une part et la température d'autre part. Ces toxines sont des métabolites secondaires dont la production ne commence qu'après plusieurs jours de prolifération des moisissures. *A.*

Tableau 1a: Principales souches de moisissures qui produisent de l'ochratoxine A*

Familles	**Espèce**
Aspergillus Micheli	
Groupe *Aspergillus ochraceus*	
	Asp. sulphureus (Fres.) Thom and Church
	Asp. sclerotiorum Huber
	Asp. alliaceus Thom and Church
	Asp. melleus Yukawa
	Asp. ochraceus Wilhelm
	Asp. ostianus Wehner
	Asp. petrakii Vörös
Penicillium Monoverticillata:	
Penicillium frequentans	
	P. purpurescens Sopp
Penicillium Asymmetrica-Lanata:	
P. commune	
	P. commune Thom
Penicillium Asymmetrica-Fasciculata	
P. verrucosum	
	P. viridicatum Westling
	P. palitans Westling
P. cyclopium	
	P. cyclopium Westling
	P. aurantiogriseum
Penicillium Biverticillata-Symmetrica	
P. purpurogenum	
	P. variabile Sopp

Tableau 1b: Souches de moisissures productrices d'ochratoxine A qui produisent par ailleurs d'autres toxines néphrotoxiques ou cohabitent avec des moisissures productrices de mycotoxines majeures (aflatoxines, acide penicillique, citrinine)

Moisissures et co-production	**Toxines co-produites**
P. purpurescens	Citrinine
P. commune	Acide penicillique,
P. aurantiogriseum, P. viridicatum	Citrinine, acide penicillique, viomelléine
Aspergillus sulphureus	Acide penicillique
Asp. ochraceus	Acide penicillique, viomelléine
Asp. petrakii	Acide penicillique
Moisissures et co-habitation	
Asp. ochraceus et *Asp. flavus*	Aflatoxines
Asp. ochraceus et divers *Penicillium*	Citrinine, patuline, acide cyclopiazonique, acide penicillique,acide kojique, etc....

* Données sélectionnées à partir du rapport du Deutsche Forschungsgemeinschaft (1990)

ochraceus peut produire plus de 400mg/kg de maïs dans les conditions de laboratoire. Mais les concentrations les plus élevées qu'on ait trouvées dans des aliments contaminés sont de 28 µg/kg en Europe et 48 µg/kg en Afrique du Nord (Krogh, 1987; Van Egmond, 1991; Maaroufi *et al.*, 1995)

Quelquefois les moisissures qui produisent l'ochratoxine A peuvent produire en même temps d'autres toxines ou cohabiter avec d'autres moisissures qui produisent des toxines différentes, telles que la citrinine produite par certains *Penicillium* (Sansing *et al.*, 1976; Kanisawa, 1984) ou les aflatoxines produites par *Aspergillus flavus* (Steyn, 1993). Ces toxines et bien d'autres présentent des synergies avec l'OTA. Ce qui peut poser des problèmes quant à l'attribution des effets toxiques observés.

II - ÉTIOLOGIE DES INTOXICATIONS

Dans certaines régions des Balkans (notamment la région de Kaniza) les personnes atteintes de néphropathie et/ou de tumeurs du tractus urinaire ont de l'OTA dans le sang (de 2 ng à 40 ng/ml) et des concentrations d'OTA plus élevées dans la nourriture que dans les autres zones (Chernozemsky *et al.*, 1977; Ceovic *et al.*, 1976; Plestina *et al.*, 1990; Petkova-Bocharova *et al.*, 1991). On trouve aussi plus d'OTA dans le sang des personnes saines des régions infestées par les moisissures toxinogènes que dans le sang des populations saines des autres régions. La néphropathie observée chez ces personnes a beaucoup de ressemblance avec celle observée chez le porc suite à une contamination naturelle des aliments par des moisissures productrices d'ochratoxines, ou reproduite expérimentalement chez le porc par ajout d'OTA pure à la nourriture (Krogh, 1977; Madsen *et al.*, 1982; Mortensen *et al.*, 1983). Pour toutes ces raisons et après avoir éliminé toutes les autres causes possibles, l'OTA est considérée comme l'agent causal principal de cette maladie, la néphropathie endémique des Balkans (NEB) qui est une tubulonéphrite interstitielle d'évolution lente, très souvent associée à des tumeurs du tractus urinaire (Chernozemsky *et al.*, 1977; Petkova-Bocharova *et al.*, 1988).

Dans tous les pays où l'OTA a été cherchée, elle a été trouvée aussi bien dans l'alimentation (céréales, fruits secs, haricots, café, cacao, bière, etc.) que dans le sang humain et celui des animaux tels que porcins et volailles (Krogh, 1987; Kuiper-Goodman & Scott, 1989), alors que chez les digastriques seules de très faibles traces d'OTA sont détectées en plus de la partie isocoumarinique appelée OTalpha qui provient du clivage de l'OTA par des bactéries du tube digestif de ces herbivores.

L'OTA a été retrouvée dans le lait de femme en Italie (Micco *et al.*, 1991) et dans le lait de vache. Ces deux aliments constituent donc une source de contamination pour les enfants en bas âge.

Plusieurs données permettent de penser que les analogues de l'OTA participent également à l'intoxication, car les effets toxiques sont toujours plus sévères quand les animaux sont nourris avec des aliments moisis que lorsqu'ils reçoivent la même quantité d'OTA pure dans leur ration (Madsen *et al.*, 1982).

Bien qu'on n'ait pas pu démontrer le lien direct de cause à effet entre l'OTA dans l'alimentation, dans le sang humain et des cas de néphropathie dans les pays d'Eu-

rope autres que les Balkans, il est toujours possible de montrer que lorsque la prise journalière d'OTA est calculée sur les bases des concentrations trouvées dans les aliments et la ration type d'une population donnée, la concentration sanguine d'OTA reflète les niveaux de contamination des aliments (Kuiper-Goodman & Scott, 1989; Breitholtz *et al.*, 1991)

Une étude récente effectuée en Tunisie englobant des patients atteints d'une néphropathie interstitielle chronique et des témoins non-malades a montré que dans plus de 90% des cas les taux sanguins d'OTA étaient en rapport avec les taux de contamination des aliments chez les malades. Ces taux étaient significativement plus élevés que ceux des témoins ($p<0,001$), 16ppb dans la nourriture et 1,2ng/ml de sang en moyenne contre >200 ppb en moyenne et > 50 ng/ml de sang en moyenne (Maaroufi *et al.*, 1995)

Cette étude montre aussi que les patients qui surveillent leur alimentation et évitent les aliments susceptibles d'être contaminés voient leur taux sanguins d'OTA baisser. Tous ces éléments sont en faveur d'une origine presque exclusivement alimentaire de l'intoxication par l'ochratoxine A. Mais un cas d'intoxication par inhalation a été décrit en Italie où des paysans ont présenté une insuffisance rénale aiguë après avoir respiré des spores d'*Aspergillus ochraceus* dans un grenier resté fermé pendant deux ans (Di Paolo *et al.*, 1993). Il n'est donc pas impossible que des personnes puissent être intoxiquées par la manutention de céréales contaminées par des moisissures productrices d'ochratoxine, comme cela a été décrit pour l'aflatoxine B1 chez des dockers (Baxter *et al.*, 1981).

III - ABSORPTION, DISTRIBUTION DE L'OCHRATOXINE A

A/ Absorption et fixation aux protéines sanguines

Il est utile de rappeler la structure de l'OTA, qui est l'analogue structural de la L-β-phénylalanine couplée à une 7-dihydroisocoumarine chlorée en 5 (van der Merwe *et al.*, 1965). Le chlore jouerait un rôle important dans la toxicité par son électronégativité. En perdant son chlore l'OTA perd en très grande partie sa cytotoxicité, car semble-t-il OTB qui est le dérivé non-chloré de l'OTA franchit moins bien les bio-membranes et agit moins bien au niveau cellulaire (Størmer *et al.*, 1985; Roth *et al.*, 1989). L'OTA est un acide faible qui en milieu acide est plutôt soluble dans les solvants organiques et donc lipophile, et en milieu alcalin soluble dans l'eau. L'OTA est donc très bien absorbée dans l'estomac. Théoriquement elle devait être moins bien absorbée dans le jéjunum et dans l'intestin. Mais Kumagai et Aibara (1982) ont montré qu'il n'en est rien. En effet même en présence de concentrations plasmatiques d'OTA plus élevées que les concentrations intestinales, la toxine passe préférentiellement de l'intestin vers le sang. De plus, il y a un cycle entérohépatique qui ramène sans cesse vers l'intestin de l'OTA native (Roth *et al.*, 1988), des conjugués à l'acide glucuronique, au sulfate, et sans doute au glutathion. Ces conjugués sont normalement hydrolysés par l'équipement enzymatique de la flore intestinale et réabsorbés rapidement, ce qui conditionne un temps de demi-vie extrêmement long dans l'organisme. Les peptidases intestinales ou spécifiques à certains organes ou introduits dans l'organisme comme additifs alimentai-

res vont cliver une partie de l'OTA en OTalpha non toxique mais qui se révèle génotoxique et dont une partie reformerait de l'OTA.

L'ochratoxine A se lie à 90-95% aux protéines plasmatiques. L'affinité pour les protéines plasmatiques varie en fonction des espèces animales (Galtier *et al.*, 1981). C'est le facteur déterminant dans la demi-vie de l'OTA. L'OTA se lie à deux entités protéiques dans le plasma. L'albumine sérique avec une affinité de 1 x 10^6 M^{-1} et une protéine de masse molaire 20 000D, avec une affinité de 0,23 x 10^9 M^{-1} (Stojkovic *et al.*, 1984; Sigrid & Hult, 1989). Ce dernier site est considéré comme un site de forte affinité. C'est là que l'OTA se lie de préférence quand les concentrations plasmatiques sont faibles. Lors d'études sur culture cellulaire en présence d'albumine sérique les concentrations cytotoxiques d'OTA varient nettement en fonction du taux de sérum ajouté au milieu (Grosse *et al.*, 1995; Baudrimont *et al.*, 1995b).

B/ Transport rénal de l'ochratoxine A

Pour son transport intra rénal l'OTA emprunte la voie du succinate, (Ki =3,9 mM), celle du sulfate (Ki =1,2 mM), et celle du para aminohippurate (PAH), (Ki = 0,02 mM) (Ullrich, 1991). Plus tard nous avons montré en collaboration avec l'équipe du Professeur Ullrich que l'OTalpha emprunterait les mêmes voies, moins efficacement. L'OTA entre donc en compétition avec les anions organiques (dont le PAH) (Kane, 1986; Sokol *et al.*, 1988) pour son absorption rénale et aussi avec les cations organiques dont l'acétate de tétraéthylammonium. L'OTA utilise aussi le même transporteur que le probénécide. Les concentrations inhibitrices d'OTA sont de l'ordre de 3,2 x 10^5 M^{-1} à 1 x 10^4 M^{-1}. Tous ces systèmes de transport ont en général besoin d'ATP. Or l'OTA inhibe la production d'ATP au niveau mitochondrial in vitro pour des concentrations de l'ordre de 1 x 10^6 M^{-1} (Friis *et al.*, 1988; Sokol *et al.*, 1988; Jung & Endou, 1989).

Dans des cellules d'origine rénale l'OTA inhiberait les canaux chlore (Gelke *et al.*, 1993) de à 0.03 x 10^6 M^{-1}. Cette dernière propriété n'aurait peut être pas une importance déterminante dans la toxicité de l'OTA puisqu'elle siègerait au niveau postproximal. Et l'OT alpha et l'OTB non toxiques pourraient également inhiber les mêmes canaux, comme on l'a observé au niveau des transports rénaux de l'OTA, alors qu'elles n'ont pas d'effet cytotoxique (Creppy *et al.*, 1983b; Creppy *et al.*, 1986; Kane *et al.*, 1986b; Roth *et al.*, 1989; Gekle *et al.*,1993). De plus un tel blocage des canaux chlore induit une alcalinisation du milieu intracellulaire (Gekle *et al.*, 1993) qui devrait favoriser la solubilité dans l'eau de la molécule et son élimination.

C/ Distribution de l'ochratoxine A dans le rein, et les autres organes

Les études de biodistribution de l'OTA marquée ont révélé que le tissu rénal était le plus contaminé (Kane *et al.*, 1986a, b; Kane 1986; Mortensen *et al.*, 1983; Fuchs *et al.*, 1988a, b) en cas d'intoxication aiguë ou chronique. La distribution tissulaire dépend de l'âge. Les jeunes animaux ont plus d'OTA dans les tissus que les plus âgés pour la même dose ingérée et les femelles ont un peu plus d'OTA que les mâles, (Kane, 1986; Kane *et al.*, 1986a). Cela pourrait expliquer la plus grande susceptibilité des femelles à la néphrotoxicité de l'OTA.

Ces résultats ont été confirmés en utilisant de l'ochratoxine non marquée et en ne dosant que la toxine native par CLHP. Plus il y a d'OTA dans le sang plus il y en aura dans les tissus, surtout ceux qui ont une surcharge lipidique.

La contamination du rein de porc par l'OTA au seuil 25 µg/kg condamnait la carcasse à être jetée en Scandinavie et plus particulièrement au Danemark. On a donc recherché les moyens d'éliminer l'ochratoxine des reins chez le porc. Le premier moyen proposé était de donner une alimentation sans OTA. Dans ce cas on voit le taux de contamination tissulaire de l'OTA baisser progressivement pour tomber en dessous du seuil fatidique de 25 µg/kg en quelques semaines (Mortensen *et al.*, 1983) même si les lésions rénales persistent. Dans ce cas une relation lie le taux plasmatique et les concentrations tissulaires, respectivement, pour le rein et le foie, 0,0651 x concentration plasmatique; et 0,0346 x concentration plasmatique. Ce qui confirme bien que le rein est toujours plus contaminé que le foie.

IV - MÉCANISME D'ACTION ET MÉTABOLISME GLOBAL DE L'OCHRATOXINE A

A/ Mécanisme principal: Inhibition de la synthèse protéique

L'ochratoxine A inhibe la synthèse des protéines au niveau de l'étape de l'élongation en empêchant la charge de la phénylalanine sur son tRNA spécifique (Bunge *et al.*, 1978; Heller & Röschenthaler, 1978; Creppy *et al.*, 1979a, b). Cela entraîne l'inhibition de la synthèse des protéines dans les cultures de cellules et in vivo, (Creppy *et al.*, 1983b, 1984, 1986) et en conséquence celle des acides nucléiques (Meisner *et al.*, 1983). Ce mécanisme a été généralisé aux analogues de l'ochratoxine A possédant un autre acide aminé à la place de la phénylalanine, qui inhibent respectivement les réactions de l'aminoacyl-tRNA synthétase spécifique de l'acide aminé dont ils sont dérivés (Creppy *et al.*, 1983c). Depuis, des analogues naturels de l'OTA ont été découverts (Hadidane *et al.*, 1992). Ce qui confirme qu'en cas de contamination naturelle l'homme ou l'animal est exposé à un mélange d'ochratoxines avec en conséquence des synergies.

Ce pouvoir inhibiteur de l'OTA qui explique l'essentiel des effets toxiques, (Creppy *et al.*, 1980) n'épargne pas non plus certains enzymes qui interviennent dans sa propre métabolisation. Ainsi les taux des CYP-450 et ceux de l'aminopyrine déméthylase et de l'alanine hydroxylase sont abaissés par l'OTA (1,5 mg/kg pendant 15 jours), alors que les enzymes de la phase II du métabolisme des xénobiotiques ne seraient pas touchés (Galtier *et al.*, 1984).

B/ Production d'ochratoxine alpha

L'ochratoxine A est transformée au niveau intestinal et in vitro par des peptidases (dont la carboxypeptidase) en OTalpha (Pitout, 1969) non toxique mais dont la génotoxicité vient d'être démontrée (Föllmann *et al.*, 1995). Chez les bovins adultes toute l'OTA est ainsi clivée en OTalpha. Pour l'estimation de l'exposition à l'OTA, il serait sans doute intéressant de déterminer aussi le taux global d'OTalpha.

C/ Production des dérivés hydroxylés

En présence de NADPH et de microsomes de foie de porc, de rat et d'homme, l'OTA est métabolisée en composés hydroxylés, les 4[R] et 4[S]-4-hydroxyochratoxine A (Størmer *et al.*, 1981; Ueno, 1985; Oster *et al.*, 1991). Dans les mêmes conditions et avec des microsomes de lapin l'OTA donne la 10-hydroxyochratoxine A (Størmer *et al.*, 1983; Størmer, 1992).

Il a également été montré que l'OTA est substrat de la phénylalanine hydroxylase qui la transforme en partie en tyrosine-ochratoxine A (Creppy *et al.*, 1990). Ce dérivé est cytotoxique (Creppy *et al.*, 1983b) tout comme la 4[R]-4-hydroxyochratoxine A qui en plus est immunosuppressive (Creppy *et al.*, 1983a).

Les CYP-450 impliqués dans la formation des composés hydroxylés de l'OTA sont chez le rat le CYP-448 ou (CYP1A2) pour l'isomère R et le CYP2B1, pour l'isomère S. Chez le porc, les CYP-450 impliqués seraient CYP2B et CYP2C11 respectivement classés A2 et A3 (Ueno 1985; Galtier *et al.*, 1984; Castegnaro *et al.*, 1989; Hennig *et al.*, 1991; Fink-Gremmels *et al.*, 1993).

Chez l'homme il a été montré, en utilisant des CYP 450 humains spécifiques clonés dans des cellules, que ce sont les CYP 1A2, 2D6 et 3A4 qui interviennent essentiellement.

Dans le tissu particulier qu'est le testicule, la [4R]-4-hydroxyochratoxine A est détectée en réponse à l'exposition des rongeurs à l'OTA. Dans le même temps le taux de testostérone augmente fortement sans modification du taux de LH (Gharbi *et al.*, 1993).

Un métabolite plus lipophile que l'OTA et non identifié à ce jour a été trouvé dans les microsomes de foie de porc (Oster *et al.*, 1991).

L'implication du métabolisme de l'OTA dans sa néphrotoxicité a été analysée récemment par Delacruz et Bach (1990). De nombreuses données indiquent de plus en plus que le métabolisme de l'OTA est aussi impliqué dans sa génotoxicité (Suzuki *et al.*, 1986; Pfohl-Leszkowicz *et al.*, 1993a, b, c; Grosse *et al.*, 1995).

Outre le polymorphisme génétique qui serait impliqué dans la métabolisation de l'OTA (Hietanen *et al.*, 1986; Castegnaro *et al.*, 1989) il est important de rappeler l'effet des inducteurs et des inhibiteurs des enzymes du métabolisme des xénobiotiques. Ainsi le phénobarbital et le méthylcholanthrène inducteurs de CYP-450 diminuent la toxicité de l'OTA car la valeur de la DL50 est augmentée (Moroï *et al.*, 1985; Chakor *et al.*, 1988). Cependant un traitement prolongé avec le phénobarbital et l'OTA entraîne un taux de tumeurs hépatiques accru chez la souris (Suzuki *et al.*, 1986). Ce qui signifie que certains des métabolites formés sous l'effet de cet inducteur sont moins toxiques que l'OTA mais restent génotoxiques et cancérogènes. Mais un ou plusieurs autres métabolites formés par d'autres voies métaboliques pourraient également être génotoxiques. C'est le cas de la tyrosine-OTA (Creppy *et al.*, 1990) qui n'a plus d'analogie structurale avec la phénylalanine et qui est toxique cependant par analogie de structure avec la tyrosine. Il faut rappeler que la phénylalanine n'a aucun effet protecteur contre les effets génotoxiques de l'OTA in vivo, alors qu'elle protège contre l'intoxication aiguë et empêche l'inhibition de la synthèse des protéines. Cela pourrait s'expliquer par l'absence d'analogie structurale avec les composés responsables des effets génotoxiques.

Le pipéronyl butoxyde augmente la toxicité de l'OTA en bloquant son métabolisme (Chakor *et al.*, 1988). Ce qui est une confirmation de la métabolisation de l'OTA par la voie des CYP 450 et des enzymes du microsome.

Il y a un si grand nombre de métabolites, que le problème est très complexe; (7 dans les hépatocytes de rat, pour l'ochratoxine A seule, Fink-Gremmels *et al.*, 1993) et peut être autant pour chaque analogue naturel. Et puis un dérivé non toxique peut cependant être génotoxique.

L'existence de dérivés glucuronoconjugués et sulfoconjugués est prouvée (Kane *et al.*, 1986a; Kane 1986) mais celle de conjugués au glutathion ou dérivés mercapturiques n'a pas été formellement prouvée même si l'apport de N-acétylcystéine diminue la génotoxicité qui pourrait être liée à ce genre de composé (Pfohl-Leszkowicz *et al.*, 1993b).

Il apparaît donc clairement que la génotoxicité et la cancérogénicité de l'OTA sont fortement influencées par son métabolisme.

D/ Lipoperoxydation et autres voies oxydatives

En 1988, Rahimtula *et al.*, ont montré que l'OTA induisait la peroxydation lipidique en présence de NADPH et de traces de Fe^{3+} (Rahimtula *et al.*, 1988; Omar *et al.*, 1991). Cette lipoperoxydation peut être mesurée par la production de malondialdehyde (MDA) in vitro et de n-hexane in vivo. La première conséquence de ce mécanisme est la modification de la perméabilité membranaire et les lésions pouvant conduire à des nécroses.

La production par l'OTA de radicaux oxygénés suite à la lipoperoxydation est généralement contrecarrée par des antioxydants et des capteurs de radicaux libres tels que vitamine A et E, et la superoxyde dismutase associée à la catalase (Baudrimont *et al.*, 1994).

Les autres voies oxydatives impliquées jusqu'ici dans le métabolisme de l'OTA sont en relation avec la cooxydation durant la synthèse des prostaglandines. Pour cela, les inhibiteurs de la prostaglandine synthétase et de la cyclooxygénase ont été essayés d'une façon globale, in vitro et in vivo et ont apporté la preuve de l'existence d'une telle voie métabolique, notamment le piroxicam, un anti-inflammatoire non stéroïdique, (Carty *et al.*, 1980; Baudrimont *et al.*, 1995a).

E/ Ochratoxine A et lésions à l'ADN

Il a été prouvé que l'OTA était génotoxique (Creppy *et al.*, 1985; Pfohl-Leszkowicz *et al.*, 1991, 1993a, b, c; Malaveille *et al.*, 1991).

Le métabolisme général de l'OTA, l'implication des voies métaboliques oxydatives dans ce métabolisme et les lésions à l'ADN sont liés d'une façon très complexe. Nous savons que les adduits à l'ADN induits par l'OTA sont réparés en grande partie en un à trois jours ou en une à trois semaines en fonction des organes et selon la dose administrée (Creppy *et al.*, 1985; Pfohl-Leszkowicz *et al.*, 1993a, b, c).

F/ Ochratoxine A et régulation des gènes?

Le taux de méthylation de l'ADN est en relation avec la régulation et l'expression des gènes, comme le montrent de multiples données en relation avec l'étude d'un

certain nombres de cancérogènes, le 3-méthyl-4-diméthylaminobenzène, la nitrosomorpholine, le chlordane (Bedford & van Helden, 1987; Münzel *et al.*, 1991).

Chez l'homme, dans les cancers primitifs et dans les métastases l'ADN des cellules est généralement hypométhylé (Bedford & van Helden, 1987). Les oncogènes cHa-ras et Ki-ras sont hypométhylés dans les adénocarcinomes à la différence des tissus normaux adjacents. De la même façon le protooncogène c myc est hypométhylé après traitement par la nitrosomorpholine.

L'azacytidine peut entraîner une hypométhylation de l'ADN (Jones, 1984), qui lui permet de réactiver des gènes inactifs du chromosome X. L'hypométhylation globale de certains gènes peut s'accompagner de l'hyperméthylation de certaines régions bien particulières (De Bustro *et al.*, 1988; De Flora *et al.*, 1985)

D'un autre côté l'hyperméthylation serait responsable de l'inactivité des gènes répresseurs (Marshall, 1991). Si le gène MyoD qui code un facteur de transcription est hyperméthylé il est inactivé mais cela n'empêche pas la cellule de se multiplier et d'arriver éventuellement à l'immortalité (Jones *et al.*, 1990).

Dans le rein qui est le tissu où sont situées principalement les tumeurs causées par l'OTA on observe essentiellement une hyperméthylation (Pfohl-Leszkowicz *et al.*, 1993c). Ceci est confirmé dans des cellules rénales en culture (Grosse *et al.*, 1995). Il y a aussi une hyperméthylation de l'ADN dans le testicule (Gharbi *et al.*, 1993) qui serait une cible potentielle. Dans les autres organes notamment dans le foie, le taux de méthylation de l'ADN a plutôt tendance à baisser. Et pourtant des tumeurs du foie ont été observées chez des souris après exposition à l'OTA (Kanisawa & Suzuki, 1978). Ainsi donc lorsque l'OTA entraîne une modification du taux de méthylation de l'ADN dans un sens comme dans l'autre, cela peut favoriser la survenue de tumeurs. Mais dans l'organe cible qu'est le rein, l'OTA entraîne une hyperméthylation et les tumeurs que l'on sait.

V - EFFETS PATHOLOGIQUES ET CONSÉQUENCES

A/ Intoxication aiguë

La toxicité aiguë de l'OTA varie beaucoup d'une espèce animale à l'autre et aussi en fonction du sexe et de la voie d'administration, (Tableau 2)

Il apparaît que de tous les animaux le porc et le chien sont les plus sensibles à l'OTA. Les rongeurs y sont nettement moins sensibles (Galtier *et al.*, 1974; Kanisawa *et al.*, 1977; Ngaha, 1985). Il n'y ∎ pas eu de cas dûment prouvé d'intoxication aiguë par l'OTA chez l'homme.

B/ Intoxication subchronique et chronique

1/ Néphrotoxicité, mutagénicité et cancérogénicité

De nombreuses études de toxicité à court terme ont montré que l'ochratoxine A est néphrotoxique pour toutes les espèces monogastriques étudiées (Suzuki *et al.*, 1975; Elling, 1977; Berndt & Hayes, 1979; Elling *et al.*, 1985; Kane *et al.*, 1986a, b; Kane,

Tableau 2: Toxicité aiguë de l'ochratoxine A

Animal	**DL_{50} (mg/kg poids)**	**Voie d'administration**	**Références**
Souris femelle	22,00	i.p	Sansing et al., 1976
Souris mâle (Swiss)	51 - 68	orale	Chakor et al., 1988
Rat mâle	28 - 30,3	orale	Galtier et al., 1974, Kanisawa et al., 1977
Rat femelle	21,4	orale	Galtier et al., 1974
Rat mâle	12,6	i.p	Galtier et al., 1974
Rat femelle	14,3	i.p	Galtier et al., 1974
Cobaye femelle et mâle	8,1 - 9,1	orale	Thacker and Carlton, 1977
Pigeon	3,4	orale	Prior et al.,1976
Dinde	5,9	orale	Prior et al., 1976
Caille	16,5	orale	Prior et al., 1976
Truite	4,7	i.p	Doster et al., 1972
Chien (mâle) Beagle	<9 (dose totale)	orale*	Szczech et al.,1973a
Porc femelle	<6 (dose totale)	orale **	Szczech et al.,1973b

* Les trois chiens qui ont reçu 3mg/kg/jour sont morts en moins de 3 jours

** Les porcs qui ont reçu 2mg/kg/jour étaient moribonds [illegible] ont dû être sacrifiés en moins de 3 jours. De même ceux qui ont reçu 1mg/kg/jour ont dû être sacrifiés en moins de 6 jours.

1986; Krogh *et al.*, 1988; Kuiper-Goodman & Scott, 1989). Les effets néphrotoxiques sont toujours proportionnels aux doses de toxine administrée. Aux fortes doses les modifications suivantes ont été observées dans la fonction rénale, augmentation de l'urée sanguine, protéinurie modérée, glucosurie. Au niveau histopathologique une dégénérescence tubulaire a été invariablement observée qui siège de préférence au niveau des tubules proximaux. Cette lésion se traduit par un amincissement de la membrane basale et une enzymurie impliquant les enzymes de la bordure en brosse (γ-glutamyl transférase, (EC 2.3.2.2.), phosphatase alkaline, (EC 3.1.3.1.) et leucine aminopeptidase, (EC 3.4.1.2.)) et un enzyme lysosomal comme la N-acétyl-β-D-glucosaminidase, (EC 3.2.1.30.) ainsi que l'élimination dans les urines de la β-2-microglobuline (Krogh *et al.*, 1974; Szczech *et al.*, 1973a, b; Kanisawa & Suzuki, 1978; Kane *et al.*, 1986a, b). Une karyomégalie peut être observée dans les cellules des tubes contournés proximaux. Les effets ci-dessus cités sont induits par des doses généralement inférieures au mg/kg. Le foie n'est touché que pour des doses nettement supérieures. Ce qui indique que le rein est l'organe cible principal des ochratoxines.

L'OTA est sans doute néphrotoxique chez l'Homme aussi, elle est fortement impliquée dans la néphropathie endémique des Balkans (NEB), car elle est responsable de la néphropathie porcine tout à fait similaire à la néphropathie humaine (Krogh *et al.*, 1974, 1977; Kuiper-Goodman & Scott, 1989; Pohland *et al.*, 1992). L'OTA est également génotoxique et cancérogène chez les rongeurs et probablement chez l'homme

(Creppy *et al.*, 1985; Petkova-Bocharova *et al.*,1988; NTP 1989; Pfohl-Leszkowicz, 1991; Pfohl-Leszkowicz, 1993a, b, c).

Quand des biopsies rénales sont effectuées, elles révèlent des adduits à l'ADN qui comigrent en très grande partie avec les adduits à l'ADN obtenus expérimentalement chez la souris traitée par l'OTA (Pfohl-Leszkowicz *et al.*, 1993a, b, c; Pfohl-Leszkowicz *et al.*, 1993a, b).

L'OTA est actuellement classée dans le groupe 2B (Produits considérés comme cancérogènes possibles pour l'Homme) par le groupe de travail des monographies du Centre International de Recherches sur le Cancer (CIRC), IARC, 1993. Des études épidémiologiques révèlent que 48% des personnes atteintes de NEB présentent des tumeurs du tractus urinaire, (uretère, pelvis, vessie), (Stojanov *et al.*, 1977, 1978; Sostaric & Vukelic, 1991; Tanchev & Dorossiev, 1991; Vukelic *et al.*, 1991).

Il faut pour qu'une mycotoxine contaminant alimentaire soit reconnue cancérogène chez l'Homme, qu'elle remplisse les 5 conditions suivantes au moins:

- présence dans l'alimentation
- preuve de l'exposition humaine
- corrélation entre l'exposition et l'incidence du type de cancer
- caractérisation et reproductibilité des symptômes chez les animaux d'expérience
- similitude du mode d'action chez les modèles animaux et chez l'Homme.

Les recherches pour établir la corrélation entre l'exposition aux mycotoxines et les risques encourus, voire les pathologies induites se heurtent donc à des difficultés de deux ordres: celles liées aux modèles animaux et celles liées à l'extrapolation des résultats de l'animal à l'Homme.

L'ochratoxine A est de plus en plus retrouvée dans les prélèvements sanguins humains en Europe de l'Ouest, notamment en Allemagne, en Scandinavie, en France et en Afrique du Nord (Tunisie, Algérie). Dans ces derniers cas, une implication dans des néphropathies humaines semble exister. Un symposium international [redacted] tenté de faire le point sur cet aspect du sujet en juillet 1993 à Bordeaux (INSERM vol.231, 1993) et plus récemment, en novembre 1994 à Monastir en Tunisie.

Chez l'homme l'OTA induit une néphropathie interstitielle chronique d'évolution lente. Elle n'est le plus souvent pas observée avant 33-35 ans. Le tableau clinique est indiqué dans le Tableau 3.

La dégénérescence tubulaire évolutive et la réduction de la fonction rénale entraînent la mise sous dialyse des malades qui représentent jusqu'à 30% de toutes les néphropathies [redacted] Afrique du Nord (Achour *et al.*, 1993) mais aussi dans les Balkans.

La NEB est 14 fois plus fréquente dans les zones endémiques que dans les zones non endémiques où la contamination par l'OTA est plus faible. La morbidité est très forte et la mortalité par NEB est de 3/1000 /an au moins. Une controverse subsiste quant au plus grand nombre de femmes atteintes par la NEB par rapport au nombre d'hommes (3 pour 2).

Tableau 3 - Signes cliniques, histopathologiques de la Néphropathie endémique des Balkans **

Signes cliniques:

- Anémie, Asthénie, Céphalée, Polyurie, Anorexie, Lumbago.

-Insuffisance rénale, Amaigrissement, Sensation de goût amer, Taux élevé d'avortements spontanés

- Absence d'oedème.

Signes biochimiques:

Urémie

β-2 microglobulinurie

Protéinurie inférieure ou égale à 700 mg/ 24 heures.

Amino-acidurie.

Signes hématologiques:

Anémie normochrome

Signes radiologiques:

Contours lisses du rein, Réduction du volume rénal, (Hypotrophie rénale asymétrique ou bilatérale).

Signes anatomo-pathologiques:

Fibrose interstitielle, Hyalinisation glomérulaire

Dégénérescence de l'épithélium tubulaire avec desquamation

Perte de la bordure en brosse

Signes histologiques:

Amincissement de la membrane basale

Signes immunologiques:

Augmentation des IgG et IgM (immunoglobulines G et M)

Dépôt d'IgG dans la membrane basale

*tiré de Austwick, PKC, The practitioner 1981

2/ Immunosuppression

Bien qu'aucun cas d'immunosuppression en rapport avec la contamination par l'OTA n'ait été décrit chez l'homme, de nombreuses études montrent dans des systèmes in vitro, dans des cellules en culture et chez des animaux d'expérience que l'ochratoxine A est un puissant immunosuppresseur (Chang *et al.*, 1979; Haubeck *et al.*, 1981; Prior & Sisodia, 1982; Creppy *et al.*, 1982, 1983a; Lea *et al.*, 1989; Størmer & Lea, 1995). Ainsi chez la souris Balb/c des doses d'OTA de l'ordre de 0,5 à 1 µg/kg, abaissent de plus de 75% la réponse immunitaire, en terme de production IgM et IgG en réponse à des globules rouges de mouton. Cet effet immunosuppresseur de l'OTA peut être reversé par la phénylalanine (Haubeck *et al.*, 1981; Creppy *et al.*, 1982, 1983a), ce qui indique que le mécanisme en cause est directement lié à l'inhibition de la synthèse des protéines par l'OTA. Lea *et al.*, 1989 ont montré que tous les types de lymphocytes étaient touchés suite à l'exposition à l'OTA. Récemment Størmer et Lea (1995) ont montré que les lymphocytes T humains stimulés étaient moins sensibles à l'OTA qu'avant la stimulation. Les conséquences de cette immunosuppression chez l'animal d'élevage peuvent être catastrophiques car elle prédispose les animaux aux maladies microbiennes ou virales.

3/ Tératogénicité

Les effets tératogènes de l'OTA ont été mis en évidence chez les rongeurs et chez les volailles, mais le porc n'est pas épargné (Hayes *et al.*, 1974; Arora & Frölen, 1981; Fukui *et al.*, 1983; Mayura *et al.*, 1984; Ballinger *et al.*, 1986; Fukui *et al.*, 1992). La difficulté dans ces études était de déterminer les périodes de la gestation ou de la vie embryonnaire où la toxine est nocive, (passage de la barrière placentaire, accumulation dans les tissus foetaux etc.). Les effets les plus souvent décrits sont une microcéphalie, des modifications du taux de certains acides aminés dans le cerveau d'animaux nouveaux nés à la suite d'exposition à l'OTA *in utero* (Arora et Frölen, 1981) et de jeunes rats (Belmadani *et al.*, 1975). Compte tenu de son mécanisme d'action dans l'inhibition de la synthèse des protéines, il n'est pas surprenant que l'OTA soit tératogène. Ceci est confirmé par le fait que la phénylalanine réverse les effets tératogènes de l'OTA, tout comme elle empêche l'inhibition de la synthèse des protéines (Mayura *et al.*, 1984).

4/ Divers

Quand des femelles sont exposées à l'ochratoxine A, celle-ci passe dans le lait (Galtier *et al.*, 1977; Miraglia *et al.*, 1993), et dans les oeufs (Fuchs *et al.*, 1988a, c), ce qui constitue une nouvelle source de contamination pour les jeunes animaux, nourris au lait et même pour les adultes.

Quand l'ochratoxine A est associée à une ou plusieurs autres mycotoxines, il y a souvent une synergie. Des exemples d'effets synergiques sont indiqués dans le tableau 4.

Certains pays ont défini des concentrations acceptables dans les aliments, tableau 5, où l'on voit que les concentrations d'OTA tolérables sont souvent inférieures à celles de l'aflatoxine B1, autre cancérogène connu.

CONCLUSION

La toxicologie de l'ochratoxine A est très complexe. Bien que le rein soit son organe cible principal, elle est distribuée dans pratiquement tous les organes et peut y induire des effets toxiques variés.

Les effets de l'OTA les plus à craindre sont les effets néphrotoxiques, génotoxiques et cancérogènes.

La toxicité aiguë ou chronique de l'OTA est liée directement ou indirectement à sa propriété d'inhiber la synthèse des protéines par compétition avec la phénylalanine dans les réactions catalysées par la phénylalanyl-tRNA synthétase (Heller *et al.*, 1977; Bunge *et al.*, 1978; Creppy *et al.*, 1979a, b). Mais l'OTA peut inhiber toutes les réactions où la phénylalanine dont elle est l'analogue structural est engagée, comme celle de la phénylalanine hydroxylase (Creppy *et al.*, 1990). Il en est de même pour les analogues structuraux naturels qui peuvent aussi inhiber les réactions dans lesquelles sont engagés les amino acides incorporés dans leur structure. Ainsi la tyrosine-OTA qui est cytotoxique (Creppy *et al.*, 1983c) pourrait inhiber les réactions menant de la tyrosine à la dihydroxyphénylalanine (DOPA).

Tableau 4 - Manifestations cliniques et toxicologiques induites par l'association de mycotoxines.

A. Aflatoxine B1 avec d'autres mycotoxines

association avec ■	effets	synergie	référence**
Ochratoxine A	Mortalité accrue, déficit pondéral, hyperplasie du foie néphropathie accentuée cancérogénicité accrue	+	Harvey et al., 1989 Brownie & Brownie 1988
acide cyclopiazonique	lésions hépatiques graves avec transaminases élevées, taux baissé de protéines sériques, cancérogénicité accrue	+	Smith et al., 1992
acide kojique	Production d'Hb corpusculaire	-	Giroir et al.,1991
déoxynivalénol	déficit pondéral, accroissement du rapport poids organe/pds du corps, cancérogénicité accrue	+	Huff et al., 1986
T2-Toxine	Déficit pondéral, accroissement du rapport poids organe/pds du corps, mortalité accrue chez les rongeurs, cancérogénicité accrue	+	Harvey 1990 Huff 1988
Rubratoxine B	létalité accrue, déficit pondéral accru, cancérogénicité de l'aflatoxine B1 inchangée	+	Hayes et al., 1977

B. Ochratoxines avec des mycotoxines autres que l'aflatoxine

association avec:			
citrinine	cytotoxicité accrue, cancérogénicité accrue chez la souris et le porc	+	Creppy et al., 1980 Kanisawa 1984 Manning et al.,1985
deoxynivalénol	Déficit pondéral accru, nette augmentation du poids d'organe /pds du corps	+	Kubena et al., 1984
acide pénicillique	mortalité accrue chez les rongeurs, lésions tubulaires rénales accrues	+	Kubena et al., 1984
T2-Toxine	déficit pondéral accru, effet tératogène accru immunosuppression accrue	+	Kubena et al., 1989

■ ceci n'est pas exhaustif

** Ces références se trouvent dans les revues et articles suivants: - Kuiper-Goodman et al., Regulatory Toxicology and Pharmacology,7, 253-306. -IARC, 1993, IARC Monograph n° 56, Iarc Lyon Ed, France. -Steyn, 1993, Colloque INSERM 1993, Vol. INSERM n°231 Creppy, Castegnaro, et Dirheimer Eds. J.Libbey Eurotext, Paris.

Tableau 5 - Concentrations maximales tolérées de certaines mycotoxines dans l'alimentation.

Continents ou Pays ou **OMS**	Toxines	Aliment	Tolérance µg/kg*	Remarques
	Aflatoxine			
USA		nourriture	20	
Europe		"bovins	10 à 50	
		"porc et "volaille	20	
France			10	
			5	nourriture pour bébé
Suisse			0	
Japon			5	
	Ochratoxine			
Europe			1 à 25	
France			5	proposition conseil supérieur d'hygiène
Pays-Bas			3	
Angleterre			10	
	Trichothécène T_2-toxine			
	Citrinine			
	Patuline			
			50	
	Zéaralénone Fumonisine			
			1000	absence de règlementation devrait être < 100 ppb

* ces valeurs risquent d'être abaissées prochainement, compte tenu de l'évolution des choses en Europe.

Les effets cytotoxiques des ochratoxines sont aussi en partie liés aux processus oxydatifs, à la mobilisation du calcium intra-cellulaire (Khan *et al.*, 1989), à l'inhibition de la respiration mitochondriale (Meisner & Chang., 1974; Wei *et al.*, 1985) et à l'inhibition de la synthèse d'ATP, (pour une revue voir Pohland *et al.*, 1992, et Størmer, 1992).

Lorsqu'une mycotoxine a été découverte, étudiée sur le plan chimique et bien identifiée dans l'alimentation ou dans l'environnement, les progrès vers une bonne

prévention et une législation adaptée dépendent à la fois des résultats expérimentaux obtenus chez l'animal, des effets possibles chez l'homme lorsqu'il y est exposé et de l'impact de tous ces travaux dans la vie économique et sociale sur le plan international. Mais l'extrapolation des données des rongeurs à l'Homme, pour les faibles doses en cause dans la cancérogenèse des mycotoxines est une véritable gageure, car il y a un très grand nombre de facteurs qui entrent en jeu

- les différences inter espèces sur le plan du métabolisme et de la distribution dans l'organisme
- le processus de la cancérogenèse
- l'hétérogénéité de l'espèce humaine (polymorphisme génétique)
- l'état sanitaire des populations concernées, leurs habitudes alimentaires la consommation ou non d'alcool, de cigarettes et / ou de médicaments.

En plus de ces facteurs, il faut ajouter les difficultés à établir un seuil tolérable dans les aliments en tenant compte des problèmes de santé publique et des problèmes économiques.

En matière de mycotoxicose humaine, "les sources d'erreurs et les écueils sont si nombreux et si imbriqués les uns dans les autres que seules les données empiriques peuvent résoudre les problèmes posés" (Ames *et al.*, 1987). Sans être aussi pessimiste, force est de constater que les problèmes de la toxicité chronique de l'Ochratoxine A sont loin d'être résolus. En effet la NEB ne recule pas, bien au contraire. Elle concernerait peut être tout le bassin méditerranéen. L'ochratoxicose animale touche de très nombreux pays et l'établissement des taux acceptables relativement bas en rapport avec les risques encourus préfigurent d'énormes difficultés pour l'agriculture en général, les céréaliers et les éléveurs de volailles et de porc en particulier. La présence d'autres mycotoxines dans les mêmes aliments, avec des effets synergiques toujours possibles constitue une source supplémentaire d'inquiétude.

Remerciements: Les résultats exposés dans ce document sont issus des programmes de recherches menées au Laboratoire de Toxicologie et Biologie Moléculaire de l'Institut de Biologie Moléculaire et Cellulaire du CNRS à Strasbourg, où ces travaux ont été initiés en 1976 par E.E. Creppy et G. Dirheimer, et de celles menées depuis 6 ans au Laboratoire de Toxicologie et d'Hygiène Appliquée de Bordeaux, Université de Bordeaux 2, ainsi que des collaborations avec des chercheurs Allemands, R. Röschenthaler depuis 1976, E. Petzinger, W. Föllmann, KJ. Ullrich, depuis 1990 [redacted] Français notamment le Dr. Castegnaro M de l'IARC de Lyon depuis 1988, Dr. Pfohl-Leszkowicz A. de l'IBMC du CNRS Strasbourg depuis 1991 et avec le Professeur H. Bacha à Monastir depuis 1983. Puissent toutes ces personnes trouver ici l'expression de la reconnaissance des auteurs.

BIBLIOGRAPHIE

ACHOUR A., EL-MAY M., BACHA H., HAMMAMI M., MAAROUFI K. et CREPPY E.E., 1993 - Néphropathies interstitielles chroniques. Approches cliniques et étiologiques: ochratoxine A. *In:* Creppy EE. Castegnaro M., Dirheimer G. (eds) Human ochratoxicosis and its pathologies, vol 231, Colloque INSERM/John Libbey Eurotext ltd, pp. 227-234.

AMES B.N., MAGAW R. and GOLD L.S., 1987 - Ranking possible carcinogenic Hazards. *Science* 236: 271-280.

ARORA R.G. and FRÖLEN H., 1981 - Interference of mycotoxins with prenatal development of the mouse. Ochratoxin A induced teratogenic effects in relation to the dose and stage of gestation. *Acta Vet. Scand.* 22: 535-552.

AUSTWICK P.K.C., 1981 - Balkan nephropathy. *The Practitioner.* 225: 1031-1038.

BACHA H., MAAROUFI K., ACHOUR A., HAMMAMI M., ELLOUZ F. et CREPPY E.E., 1993 - Ochratoxines et ochratoxicoses humaines en Tunisie. *In:* Creppy EE., Castegnero M., Dirheimer G. (eds) Human ochratoxicosis and its pathologies, vol 231, Colloque INSERM/John Libbey Eurotext ltd, pp. 111-121.

BALLINGER M.B., PHILLIPS T.D. and KUBENA L.F., 1986 - Assessment of the distribution and elimination of ochratoxin A in the pregnant rat. *J. Food Safety* 8: 11-24.

BAUDRIMONT I., BETBEDER A.M., GHARBI A., PFOHL-LESZKOWICZ A., DIRHEIMER G. and CREPPY E.E., 1994 - Effect of superoxide dismutase and catalase on the nephrotoxicity induced by subchronical administration of ochratoxin A in rats. *Toxicology* 89: 101-111.

BAUDRIMONT I., MURN M., BETBEDER A.M., GUILCHER J. and CREPPY E.E., 1995a - Effect of piroxicam on the nephrotoxicity induced by ochratoxin A in rats. *Toxicology* 95: 147-154.

BAUDRIMONT I., AHOUANDJIVO R. and CREPPY E.E., - 1995c - Lipid peroxidation induced by ochratoxin A in Vero cells in culture: effects of several preventing agents. *Chem. Biol. Interact.* (soumis à publication)

BAUDRIMONT I., BETBEDER A-M., and CREPPY E.E., 1995b - Prevention of the ochratoxin A-induced inhibition of the protein synthesis in Vero cells by A19. *Arch. of Toxicol.* (soumis à publication)

BAUER J. and GAREIS M., 1987 - Ochratoxin A in der Nahrungsmittelkette. *Z. Veterinärmed.* B. 34: 613-627.

BAXTER C.S., WILSON D.W. and BURG W.R., 1981 - A prospective analysis of the potential risk associated with inhalation of aflatoxin-contaminated grain dusts . *Food Cosmet. Toxicol.* 19: 765-769.

BEDFORD M.T. and van HELDEN P.D., 1987 - Hypomethylation of DNA in pathological conditions of human prostate. *Cancer. Res.* 47: 5274-5276.

BELMADANI A., BETBEDER A-M., TRAMU G. and CREPPY E.E., 1995 - Effects of ochratoxin A in central nervous system of rats fed subchronically: variation of free amino acids and prevention by aspartane structural analogue. *Toxicology* (soumis à publication)

BERNDT W.O. and HAYES A.W., 1979 - In vivo and in vitro changes in renal functions caused by ochratoxin A in the rat. *Toxicology* 12: 5-17.

BREITHOLTZ A., OLSEN M., DAHLBACK A., HULT K., 1991 - Plasma ochratoxin A levels in three swedish populations surveyed using an ion-pair HPLC technique. *Food Addit Contam.* 8: 183-192.

BUNGE I., DIRHEIMER G., RÖSCHENTHALER R., 1978 - In vitro and in vivo inhibition of protein synthesis in Bacillus stearothermophilus by ochratoxin A. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 83: 398-405.

CARTY T.J.G., STEVENS J.S., LOMBARDINO J.G., PARRY M.J. and RANDALL M.J., 1980 - Piroxicam, a structurally novel anti-inflammatory compound. Mode of prostaglandin synthesis inhibition. *Prostaglandins.* 19: 671-682.

CASTEGNARO M., BARTSCH H., BEREZIAT J.C., ARVELA P., MICHELON J. and BROUSSOLLE L., 1989 - Polymorphic ochratoxin A hydroxylation in rats strains phenotyped as poor and extensive metabolizers of debrisoquine. *Xenobiotica* 19: 225-230.

CEOVIC S., GRIMS P. and MITAR J., 1976 - The incidence of tumours of the urinary organs in the region of endemic nephropathy and in control region (Yugolsl.) Lijec. *Vjesn.* 98: 301-304.

CHAKOR K, CREPPY E.E. and DIRHEIMER G., 1988 - In vivo studies on the relationship between hepatic metabolism and toxicity of ochratoxin A. *Arch. Toxicol.*, Suppl. 12: 201-204.

CHANG C.F., HUFF W.E. and HAMILTON P.B., 1979 - A leucocytopenia-induced in chicken by dietary ochratoxin A. *Poultry Sci.* 58: 555-558.

CHERNOZEMSKY I.N., STOYANOV I.S., PETKOVA-BOCHAROVA, T.K., NICOLOV I.V., DRAGANOV G, STOICHEV I., TANCHEV Y., NAIDENOV D., and KALCHEVA N.D., 1977 - Geographical correlation between the occurence of endemic nephropathy and urinary tract tumours in Vratza district in Bulgaria. *J. Cancer* 19: 1-11.

CREPPY E.E., LUGNIER A.A.J., FASIOLO F., HELLER K., RÖSCHENTHALER R. and DIRHEIMER G., 1979a - In vitro inhibition of yeast phenylalanyl-tRNA synthetase by ochratoxin A. *Chem. Biol. Interact.* 24: 257-262.

CREPPY E.E., LUGNIER A.A.J., BECK G., RÖSCHENTHALER R. and DIRHEIMER G., 1979b - Action of ochratoxin A on cultured hepatoma cells-Reversion of inhibition by phenylalanine. *FEBS Lett.* 104: 287-290.

CREPPY E.E., KANE A., GIESSEN-CROUSE E., ROTH A., RÖSCHENTHALER R. and DIRHEIMER G., 1986 - Effect of ochratoxin A on enzyme activities and macromolecules synthesis in MDCK cells. *Arch. Toxicol.* Suppl. 9: 310-314.

CREPPY E.E., KERN D., STEYN P.S., VLEGAAR R., RÖSCHENTHALER R. and DIRHEIMER G., 1983c - Comparative study of the effect of ochratoxin A analogues on yeast aminoacyl-tRNA synthetases and on the growth and protein synthesis of hepatoma cells. *Toxicol. Lett.* 19: 217-224.

CREPPY E.E., LORKOWSKI G., RÖSCHENTHALER R. and DIRHEIMER G., 1982 - Kinetics of immunosuppressive action of ochratoxin A on mice. In: Proceedings V International IUPAC Symposium Mycotoxins and Phycotoxins, September 1-3, 1982 Vienna, pp. 289-292. Austrian Chem. Soc., Vienna.

CREPPY E.E., SCHLEGEL M., RÖSCHENTHALER R. and DIRHEIMER G., 1980 - Phenylalanine prevents acute poisoning by ochratoxin A in mice. *Toxicol. Lett.* 6: 77-80.

CREPPY E.E., RÖSCHENTHALER R. and DIRHEIMER G., 1984 - Inhibition of protein synthesis in mice by ochratoxin A and its prevention by phenylalanine. *Food Chem. Toxicol.* 22: 883-886.

CREPPY E.E., STØRMER F.C., RÖSCHENTHALER R. and DIRHEIMER G., 1983a - Effects of two metabolites of ochratoxin A, [4R]-4-hydroxyochratoxin A and ochratoxin alpha, on the immune response in mice. *Infect. Immun.* 39: 1015-1018.

CREPPY E.E., STØRMER F.C., KERN D., RÖSCHENTHALER R. and DIRHEIMER G., 1983b - Effects of ochratoxin A metabolites on yeast phenylalanyl-tRNA synthetase and in vitro protein synthesis of hepatoma cells. *Chem. Biol. Interact.* 47: 239-247.

CREPPY E.E., KANE A., DIRHEIMER G., LAFARGE-FRAYSSINET C., MOUSSET S. and FRAYSSINET C., 1985 - Genotoxicity of ochratoxin A in mice: DNA single-strand break evaluation in spleen, liver and kidney. *Toxicol. Lett.* 28: 29-35.

CREPPY E.E., CHAKOR K. FISHER M.J. and DIRHEIMER G., 1990 - The mycotoxin ochratoxin A is a substrate for phenylalanine hydroxylase in isolated rat hepatocytes and in vivo. *Arch Toxicol.* 64: 279-284.

CREPPY EE., CASTEGNARO M., GROSSE Y., MERIAUX J., MANIER C., MONCHARMONT P. WALLER C, 1993 - Etude de l'ochratoxicose humaine dans trois régions de France: Alsace, Aquitaine et Région Rhône-Alpes. *In:* Creppy E.E., Castegnaro M. Dirheimer G., (eds) Human ochratoxicosis and its pathologies, vol 231, Colloque INSERM/John Libbey Eurotext ltd, pp 147-158.

DE BUSTRO A., NELKIN B.D., SILVERMAN A., EHRLICH G., POIESZ B., BAYLIN S.B 1988 - The short arm of chromosome 11 is a "hot spot" for hypermethylation in human neoplasia. *Proc. Natl. Acad. Sci.* USA 85: 5693-5697.

DELACRUZ L. and BACH P.H., 1990 - The role of ochratoxin A metabolism and biochemistry in animal and human nephrotoxicity. *J. Biopharmacol. Sci.* 1: 277-304.

DE FLORA S., BENNICELLI C. and CAMOIRANO A., 1985 - In vivo effects of N-acetylcysteine on glutathione metabolism and on the biotransformation of carcinogenic and/or mutagenic compounds. *Carcinogenesis* 6: 1735-1745.

DEUTSCHE FORSCHUNGSGEMEINSCHAFT (1990)

DI PAOLO N., GUARNIERI A., LOI F., SACCHI G, MANGIAROTTI A.M. and DI PAOLO M., 1993 - Acute renal failure from inhalation of mycotoxins. *Nephron* 64: 621-625.

DOSTER R.C., SINNHUBER R.O. and WALES J.H., 1972 - Acute intraperitoneal toxicity of ochratoxins A and B in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Food and Cosmetics Toxicology*10: 85-92.

DWIVEDI P. and BURNS R.B., 1984 - Effect of ochratoxin A on immunoglobulins in broiler chicks. *Res. Vet. Sci.* 36: 117-121.

ELLING F., 1977 - Demonstration of ochratoxin A in kidney of pigs and rats by immunofluorescence microscopy. *Acta. Path. Microbiol. Scand. Sect.* A 85: 151-156.

ELLING F., NIELSEN J.P., LILLEHOJ, E.B., THOMASSEN M.S. and STØRMER F.C., 1985 - Ochratoxin A-induced porcine nephropathy: enzyme and ultra structure changes after short-term exposure. *Toxicon* 23: 247-254.

FINK-GREMMELS J., BLOM M. and WOUTERSEN F., 1993 - In vitro investigations on ochratoxin A metabolism. In Human ochratoxicosis and its pathologies, E.E.Creppy, M. Castegnaro and G. Dirheimer (Eds), John Libbey Eurotext INSERM, vol 231, pp. 67-74.

FÖLLMANN W., HILLEBRAND I.E., CREPPY E.E. and BOLT H.M., 1995 - Sister chromatid exchange frequency in culture isolated porcine urinary bladder epithelial cells (PUBEC) treated with ochratoxin A and alpha. *Arch. Toxicol.* 69: 280-286.

FRIIS C., BRINN R. and HALD B., 1988 - Uptake of ochratoxin A by slices of pig kidney cortex. *Toxicology* 52: 209-217.

FUCHS R., APPELGREN L.E. and HULT K., 1988a - Distribution of ^{14}C-ochratoxin A in the mouse monitored by whole body auto radiography. *Acta Pharmacol. Toxicol.* 63: 355-360.

FUCHS R., APPELGREN L.E. and HULT K., 1988b - Distribution of ^{14}C-ochratoxin A in the rainbow trout (Salmon gairdneri). *Acta Pharmacol. Toxicol.* 59: 220-227.

FUCHS R., APPELGREN L.E. HAGELBERG S. and HULT K., 1988c - Carbon ^{14}-ochratoxin A distribution in the Japanese quail (*Coturnix coturnix japonica*) monitored by the whole body autoradiography. *Poult. Sci.* 67: 707-714.

FUKUI Y., HAYASAKA I., INOUYE M. and KAMEYAMA Y., 1983 - Microcephaly induced in mice by prenatal exposure to ochratoxin A. *Environmental Medicine* 27: 41-49.

FUKUI Y., HAYASAKA S. ITOH M. and TAKEUCHI Y., 1992 - Development of neurones and synapses in ochratoxin A-induced micro cephalic mice: a quantitative assessment of somatosensori cortex. *Neurotoxicology and Teratology*, 14, pp. 191-196.

GALTIER P., MORE J. et BODIN G., 1974 - Toxines *d'Aspergillus ochraceus* Wilhelm III. Toxicité aigüe de l'ochratoxine A chez le rat et la souris adultes. *Annales de Recherches Vétérinaires* 5: 233-247.

GALTIER P., BONEUN B., CHARPENTEAU J.L., BODIN G., ALVINERIE M., and MORE J., 1979 - Physiopathology of haemorrhagic syndrome related to ochratoxin A intoxication in [illegible]. *Food Cosmet. Toxicol.* 17: 49-53.

GALTIER P., ALVINERIE M. and CHARPENTEAU J.L., 1981 - The pharmacokinetic profiles of ochratoxin A in pigs, rabbits and chickens. *Food Cosmet. Toxicol.* 19: 735-738.

GALTIER P., ALVINERIE M. and LE BARS J., 1984 - Comparative incidence of oral ochratoxicosis on the activity of drug-metabolizing enzymes in rat liver. *Toxicol. Lett.* 245: 7558-7560.

GEKLE M., OBERLEITHNER H. and SILBERNAGL S., 1993 - Ochratoxin A impairs "post-proximal" nephron function in vivo and blocks plasma membrane anion conductance in Madin-Darby canine kidney cells in vitro. *Eur. J. Physiol. Pflügers Arch.* 425: 401-408.

GHARBI A., TRILLON O., BETBEDER A-M., COUNORD J., GAURET M-F., PFOHL-LESZKOWICZ A., G.DIRHEIMER and CREPPY E.E., 1993 - Some effects of ochratoxin A, a mycotoxin contaminating feeds and food, on rat testis. *Toxicology* 83: 9 - 18.

GILANI S.H., BANCROFT J. and REILY M., 1978 - Teratogenicity of ochratoxin A in chick embryos. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 46: 543-546.

GROSSE Y., BAUDRIMONT I., CASTEGNARO M., BETBEDER A.M., CREPPY E.E., DIRHEIMER G., and A. PFOHL-LESZKOWICZ, 1995 - Formation of ochratoxin A metabolites and DNA-adducts in monkey kidney cells. *Chem.-Biol. Interact.* 95: 175-187.

GUPTA M., BANDYOPADDHYAY S., PAUL B. and MAJUMDER S.K., 1979 - Hematological changes produced in mice by ochratoxin A. *Toxicology* 14: 95-98.

HADIDANE R., BACHA H., CREPPY E.E., HAMMAMI M., ELLOUZ F. and DIRHEIMER G., 1992 - Isolation and structure determination of natural analogues of the mycotoxin ochratoxin A produced by *Aspergillus ochraceus. Toxicology* 76: 233-243.

HARVEY R.B., HUFF W.E., KUBENA L.F. and PHILLIPS T.D., 1989 - Evaluation of diets contaminated with aflatoxin and ochratoxin fed to growing pigs. *Am. J. Vet. Res.* 50: 1400-1405.

HAUBECK H.D., LORKOWSKI G., KOLSCH E. and RÖSCHENTHALER R., 1981 - Immunosuppression by ochratoxin A and its prevention by phenylalanine. *Appl. Environ. Microbiol.* 41: 1040-1042.

HAYES A.W., HOOD R.D. and LEE H.L., 1974 - Teratogenic effects of ochratoxin A in mice. *Teratology* 9: 93- 97.

HELLER K. and RÖSCHENTHALER R., 1978 - Inhibition of protein synthesis in streptococcus faecalis by ochratoxin A. *Can. J. Microbiol.* 24: 466-472.

HENNIG A. FINK-GREMMELS J. and LEISTNER L., 1991 - Mutagenicity and effects of ochratoxin A on frequency of sister chromatid exchange after metabolic activation. *In* Mycotoxins, endemic Nephropathy and Urinary tract Tumours, Castegnaro M, Plastina R, Dirheimer G., Chernozemsky I.N., Bartsch H (Eds), IARC Scientific Publications N°115, Lyon, pp. 255-260.

HIETANEN E., MALAVEILLE C., CAMUS A.M., BEREZIAT J.C., BRUN G., CASTEGNARO M., MICHELON J., IDLE J.R. and BARTSCH H., 1986 - Interstrain comparison of hepatic and renal microsomal carcinogen metabolism and liver S9-mediated mutagenicity in DA and Lewis rats phenotyped as poor and extensive metabolizers of debrisoquine. *Drugs Metabol. Dispos.* 14: 118-126.

HOLMBERG T., THUVANDER A. and HULT K., 1988 - Ochratoxin A as a suppressor of mitogen-induced blastogenesis of porcine blood lymphocytes. *Acta. Vet. Scand.* 29: 219-223.

IARC (1982) Environmental Carcinogens. Selected methods of analysis, vol.5 Some Mycotoxins. International Agency for Research on Cancer ed., Lyon (France).

IARC, (1993) International Agency for Research on Cancer, Monograph on the evaluation of carcinogenic risk to humans: Some naturally occurring substances, some foodstuffs and constituants, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins. In: IARC ed., IARC Lyon (France)

IPCS, International Programme on Chemical Safety (1990), Selected mycotoxins: ochratoxins, trichothecenes, ergot. Environmental criteria, WHO, Geneva, 105: 15-70.

JONES P.A., 1984 - Gene activation by 5-azacytidine. *In* A. Razin, H.Cedar, A.D. Riggs (eds). DNA methylation: Biochemistry and biological significance, New-York Springer-Verlag, pp. 165-188.

JONES P.A., WOLKOWICZ M.J., RIDEOUT W.M., GONZALES F.A., MARZIASZ C.M., COETZEE G.A., TAPSCOTT S.J., 1990 - De novo methylation of the Myo D1 CpG island during the establishment of immortal cell lines. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 87: 6117-6121.

JUNG K.Y. and ENDOU H., 1989 - Nephrotoxicity assessment by measuring cellular ATP content. II. Intranephron site of ochratoxin A nephrotoxicity. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 100: 383-390.

KANE A, 1986 - Intoxication subchronique par l'ochratoxine A, Mycotoxine contaminant les aliments: effets néphrotoxiques et génotoxiques. Thèse de doctorat de l'Université Louis Pasteur, Strasbourg.

KANE A., CREPPY E.E., ROTH A., RÖSCHENTHALER R. and DIRHEIMER G., 1986b - Distribution of the [3H]-label from low doses of radioactive ochratoxin A ingested by rats, and evidence for DNA single-strand breaks caused in liver and kidneys. *Arch. Toxicol.* 58: 219-224.

KANE A., CREPPY E.E., RÖSCHENTHALER R. and DIRHEIMER G., 1986b - Changes in urinary and renal tubular enzymes caused by subchronic administration of ochratoxin A in rats. *Toxicology* 42: 233-243.

KANISAWA M., SUZUKI S., KOZUKA W. and YAMAZAKI M., 1977 - Histopathological studies on the toxicity of ochratoxin A in rats. I. Acute oral toxicity. *Toxicology and Applied Pharmacology* 42: 55-64.

KANISAWA M., SUZUKI S., 1978 - Induction of renal and hepatic tumours in mice by ochratoxin A, a mycotoxin. *Gann* 69: 599-600.

KANISAWA M., 1984 - Synergistic effect of citrinin on hepatorenal carcinogenesis of ochratoxin A in mice. *Devel. Food Sci* 7: 245-254.

KAWAMURA O., MAKI S., SATO S. and UENO Y., 1993 - Ochratoxin A in livestock and human sera quantified by a sensitive ELISA. In Human ochratoxicosis and its pathologies, E.E.Creppy, M. Castegnaro and G. Dirheimer (Eds), John Libbey Eurotext INSERM, vol. 231, pp. 159-165.

KHALEF A., BENABADJI M., RAYAN T. et HADDOUMI F., 1993 - Présence de l'ochratoxine A dans le sang humain et néphropathie en Algérie. *In* Creppy EE. Castegnaro M., Dirheimer G. (eds) Human ochratoxicosis and its pathologies, vol 231, Colloque INSERM/John Libbey Eurotext itd, pp. 235-238.

KHAN S., MARTIN M., BARTSCH H. and RAHIMTULA A.D., 1989 - Perturbation of liver microsomal calcium homeostasis by ochratoxin A. *Biochem. Pharmacol.* 38: 67-72.

KROGH P., 1974 - Mycotoxic porcine nephropathy: a possible model for Balkan endemic nephropathy. In Endemic Nephropathy. Proceedings of the Second international Symposium on Endemic Nephropathy. Edited by A. Puchlev. pp. 266-270. Publishing House of the Bulgarian Academy of Science, Sofia.

KROGH P., 1977 - Ochratoxins In: Mycotoxins in human and animal health (J.V. Rodricks, C.W. Hesseltine and M.A. Mehlman eds.), Pathotox, Forest Park South, Ill., pp. 489-498.

KROGH P., 1987 - Mycotoxins in food. Edited by P. Krogh. Academic Press, Cambridge, pp. 1- 27.

KROGH P., GYRD-HANSEN N., HALD B., LARSEN S., NIELSEN J.P., SMITH M., IVANOFF C. and MEISNER H., 1988 - Renal enzyme activities in experimental ochratoxin A induced porcine nephropathy: diagnostic potential of phosphoenolpyruvate carboxykinase and gamma-glutamyl transpeptidase activity. *J. Toxicol. Environ. Health.* 23: 1-14.

KUIPER-GOODMAN T. and SCOTT P.M., 1989 - Risk assessment of the mycotoxin ochratoxin A. *Biomedical and Environmental Sciences* 2: 179-248.

KUMAGAI S., AIBARA K., 1982 - Intestinal absorption and secretion of ochratoxin A in the rat. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 64: 94-102.

LEA T., STEIN K. and STØRMER F.C., 1989 - Mechanism of ochratoxin A-induced immunosuppression. *Mycopathology* 107: 153-159.

MAAROUFI K, ACHOUR A, HAMMAMI M, EL-MAY M, BETBEDER A-M, ELLOUZ F, CREPPY EE, BACHA H., 1995 - Ochratoxins in human blood in relation to nephropathy in Tunisia. *Human Exp Toxicol* 14: 609-615.

MADSEN A., MORTENSEN. and HALD B., 1982 - Feeding experiments with ochratoxin A contaminated barley for bacon pigs. I. Influence on pig performance and residues *Acta Agric. Scand.* 32: 225-239.

MALAVEILLE C., BRUN G. and BARTSCH H., 1991 - Genotoxicity of ochratoxin A and structurally related compounds in *Escherichia coli* strains: studies on their mode of action. *In:* Mycotoxin, endemic nephropathy and urinary tract tumours. Castegnaro M., Plestina R., Dirheimer G., Chernozemsky, I.N. and Bartsch H., eds (IARC Scientific publications N°115), Lyon, International Agency for Research on Cancer, pp. 261-266.

MARSHALL C.J., 1991 - Tumour suppressor genes. *Cell* 64: 313-326.

MAYURA K., EDWARDS J.F., MAULL E.A. and PHILLIPS T.D., 1989 - The effects of ochratoxin A on post implantation rat embryos in culture. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 18: 411-415.

MAYURA K., STEIN A.F., BERNDT W.O. and PHILLIPS T.D., 1984 - Teratogenic effects of ochratoxin A in rats with impaired renal function. *Toxicology* 32: 277-285.

MEISNER H., CIMBALA M.A .and HANSON R.W., 1983 - Decrease of renal phosphoenolpyruvate carboxykinase RNA and poly (A) RNA level by ochratoxin A. *Arch. Biochem. Biophys.* 223: 264-270.

MEISNER H. and CHANG S., 1974 - ochratoxin A, [redacted] inhibitor of mitochondrial transport system. *Biochemistry* 13: 2795-2800.

MICCO C., AMBRUZZI M.A., MIRAGLIA M., BRERA C., ONORI R. and BENELLI L., 1991 - Contamination of human milk with ochratoxin A. *In* Mycotoxins, Endemic Nephropathy and Urinary Tract Tumours. Castegnaro M., Plestina R., Dirheimer G., Chernozemsky, I.N. and Bartsch H., eds. IARC Scientific publication, n° 115, pp. 105-108.

MIRAGLIA M., BRERA C., CORNELI S. and DE DOMINICIS R., 1993 - Ochratoxin A in Italy: status of knowledge and perspectives. Human ochratoxicosis and its pathologies. Eds Creppy E.E.,Castegnaro M., Dirheimer G., Colloque INSERM/John Libbey Eurotext Ltd. Vol 231, pp. 129-139.

MOROI K., SUZUKI S., KUGA T., YAMAZAKI M. and KANISAWA M., 1985 - Reduction of ochratoxin A toxicity in mice treated with phenylalanine and phenobarbital.. *Toxicol. Lett.* 25: 1-5.

MORTENSEN H.P., HALD B. LARSEN A.E. and MADSEN A., 1983 - Ochratoxin A contaminated barley for sows and piglets. *Acta Agric. Scand.* 33: 349-352.

MÜNZEL P.A., PFOHL-LESZKOWICZ A., ROHRDANZ E., KEITH G., DIRHEIMER G. and BOCK K.W., 1991 - Site-specific hypomethylation of c-myc protooncogene in liver nodules and inhibition of DNA methylation by N-nitrosomorpholine. *Biochem. Pharmacol.* 42: 365-373.

NGAHA E.O., 1985 - Biochemical changes in the rat during experimentally induced acute ochratoxicosis. *Enzyme* 33: 1-8.

NTP (1989) -NTP Technical Report on the Toxicology and Carcinogenesis Studies of ochratoxin A (Cas n° 303-47-9) in F344/N-Rats (Gavage studies) G. Boorman, Ed.) NIH Publication N° 89-2813, US Department of Health and Human Services, National Institutes of Health, Research Triangle Park, NC.

OMAR R.F., RAHIMTULA A.D. and BARTSCH H., 1991 - Role of cytochrome P-450 in ochratoxin A stimulated lipid peroxidation. *J. Biochem. Toxicol.* 6: 203-209.

OSTER T. JAYYOSI Z., CREPPY E.E., El HAMRI H.S. and BATT A-M., 1991 - Characterization of pig liver purified cytochrome P-450 isoenzymes for ochratoxin A metabolism studies. Toxicol. Lett. 57: 203-214.

PETKOVA-BOCHAROVA T., CASTEGNARO M. MICHELON J. and MARU V., 1991 - Ochratoxin A and other mycotoxins in cereals from an area of Balkan endemic nephropathy and urinary tract tumours in Bulgaria. *In* Mycotoxins, Endemic Nephropathy and Urinary Tract Tumours. Castegnaro M., Plestina R., Dirheimer G., Chernozemsky, I.N. and Bartsch H., eds. IARC Scientific publication, n° 115, pp. 83-87.

PETKOVA-BOCHAROVA T., CHERNOZEMSKY I.N. and CASTEGNARO M., 1988 - Ochratoxin A in relation to Balkan endemic nephropathy and urinary system tumours in Bulgaria. *Food Addit. Contam.* 5: 299-301.

PFOHL-LESZKOWICZ A., CHAKOR K., CREPPY E.E. and DIRHEIMER G., 1991 - DNA-adduct formation in mice treated with ochratoxin A. *In* Mycotoxins, Endemic Nephropathy and Urinary Tract Tumours. Castegnaro M., Plestina R., Dirheimer G., Chernozemsky, I.N. and Bartsch H., eds. IARC Scientific publication, n° 115, pp. 245-253.

PFOHL-LESZKOWICZ A., GROSSE Y., KANE A., CREPPY E.E. and DIRHEIMER G., 1993a - Differential DNA-adduct formation and disappearance in three mice tissues after treatment by the mycotoxin ochratoxin A. *Mutation Res.* 289: 265-273.

PFOHL-LESZKOWICZ A., GROSSE Y., KANE A., GHARBI A., BAUDRIMONT I., OBRECHT S.M., CREPPY E.E. and DIRHEIMER G., 1993b - Is the oxidative pathway implicated in the genotoxicity of ochratoxin A. *In* Human ochratoxicosis and its pathologies, E.E.Creppy, M. Castegnaro and G. Dirheimer (Eds), John Libbey Eurotext INSERM, vol 231, pp. 177-188.

PFOHL-LESZKOWICZ A., GROSSE Y., OBRECHT S.M., KANE A., CASTEGNARO M., CREPPY E.E. and DIRHEIMER G., 1993c - Preponderance of DNA-adducts in kidney after ochratoxin A. In: Human ochratoxicosis and its pathologies, E.E.Creppy, M. Castegnaro and G. Dirheimer (Eds), John Libbey Eurotext INSERM, vol 231, pp. 199-208.

PITOUT M.J., 1969 - The hydrolysis of ochratoxin A by some proteolytic enzymes. *Biochem. Pharmacol.* 18: 1829-1836.

PLESTINA R., CEOVIC S., GATENBECK S., HABAZIN-NOVAK V., HULT K., HÖKBY E., KROGH P. and RADIC B., 1990 - Human exposure to ochratoxin A in areas of Yugoslavia with endemic nephropathy. *J. Environ. Pathol. Toxicol. Oncol.* 10: 145-148.

POHLAND A.E., NESHEIM S. and FRIEDMAN L., 1992 - Ochratoxin A: A review. *Pure and Appl. Chem.* vol. 64 (7): 1029-1046.

PRIOR M.G. and SISODIA C.S., 1982 - The effects of ochratoxin A on immune response of Swiss mice. *Canad. J. of Comp. Med.* 46: 91-96.

RAHIMTULA A.D., BEREZIAT J.C. BUSSACCHINI-GRIOT V. and BARTSCH H., 1988 - Lipid peroxidation as a possible cause of ochratoxin A toxicity. *Biochem. Pharmacol.* 37: 4469-4477.

ROTH A., CHAKOR K., CREPPY E.E., KANE A., RÖSCHENTHALER R. and DIRHEIMER G., 1988 - Evidence for an enterohepatic circulation of ochratoxin A in mice. *Toxicology* 48: 293-308.

ROTH A., CREPPY E.E., KANE A., BACHA H., STEYN S.P., RÖSCHENTHALER R. and DIRHEIMER G., 1989 - Influence of ochratoxin B on the ochratoxin A inhibition of phenylalanyl-tRNA Phe formation in vitro and protein synthesis in hepatoma tissue culture cells. *Toxicol Lett.* 45: 307-314.

SANSING G.A., LILLEHOJ E.B., DETROY R.W. and MILLER M.A., 1976 - Synergistic toxic effects of citrinin, ochratoxin A and penicillic acid in mice. *Toxicon* 14: 213-220.

SCOTT De.B., 1965 - Toxigenic fungi isolated from cereal and legume products, *Mycopathol. Mycol. Appl.* 25: 213-222.

SCOTT P.M., VAN-WALBEEK W., KENNEDY B., and ANYETI D., 1972 - Mycotoxins (ochratoxin A, citrinin, and sterigmatocystin) and toxigenic fungi in grains and other agricultural products. *J. Agric. Food Chem.* 20: 1103-1109.

SIGRID H. and HULT K., 1989 Toxicokinetics of ochratoxin A in several species and its plasma binding properties *J. Appl. Toxicol.* 9: 91-96.

SOKOL P.P., RIPICH G., HOLOHAN P.D. & ROSS C.R., 1988 - Mechanism of ochratoxin A transport in Kidney. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 246: 460-465.

SOSTARIC B. and VUKELIC M., 1991 - Characteristics of urinary tract tumours in the area of Balkan endemic nephropathy in Croatia. *In:* Mycotoxins, Endemic Nephropathy and Urinary Tract Tumours. Castegnaro M., Plestina R., Dirheimer G., Chernozemsky, I.N. and Bartsch H., eds. IARC Scientific publication, n° 115, pp. 29-35.

STEYN P.S., 1993 - Mycotoxins of human health concern. *In*: Human ochratoxicosis and its pathologies, E.E.Creppy, M. Castegnaro and G. Dirheimer (Eds), John Libbey Eurotext INSERM, vol 231, pp. 3-31.

STOJKOVIC R., HULT K., GAMULIN S. and PLESTINA R., 1984 - High affinity binding of ochratoxin A to plasma constituents. *Biochem. Int.* 9: 33-38.

STOYANOV I.S., STOJCHEV I.I., NICOLOV I.G., DRAGANOV I.V., PETKOVA-BOCHAROVA T.K., and CHERNOZEMSKY I.N., 1977 - Cancer mortality in a region with endemic nephropathy. *Neoplasma* 24: 625-632.

STOYANOV I.S., CHERNOZEMSKY I.N., NICOLOV I.G., STOJCHEV I.I. and PETKOVA-BOCHAROVA T.K., 1978 - Epidemiologic association between endemic nephropathy and urinary system tumors in an endemic region. *J. Chronic Dis.* 31: 721-724.

STØRMER, F.C., HANSEN C.E., PEDERSEN J.I. HVISTENDAHL G. and AASEN A.J., 1981 - Formation of (4R) and (4S)-4-hydroxyochratoxin A from ochratoxin A by liver microsomes from various species. *Appl. Environ. Microbiol.* 42: 1051-1056.

STØRMER F.C., STØREN O., HANSEN C.H., PEDERSEN J.I. and AASEN A.J., 1983 - Formation of [4R]-4- and [4S]-4-hydroxyochratoxin A and 10-hydroxyochratoxin A from ochratoxin A by rabbit liver microsomes *Appl. Environ. Microbiol.* 45: 1183-1187.

STØRMER F.C., KOLSAKER P., HOLM H., ROGSTAD S. and ELLING F., 1985 - Metabolism of ochratoxin B and its possible effects upon the metabolism and toxicity of ochratoxin A in rats. *Appl. Environ. Microbiol.* 49: 1108-1112.

STØRMER F.C., 1992 - Ochratoxin A - A mycotoxin of concern. In Handbook of applied Mycology. Mycotoxins in Ecological Systems. Bhatnagar D, Lillehoj E.B., Arora, D.K. (Eds), vol.5, M. Dekker, Inc, pp. 403-432.

STØRMER F.C., LEA T., 1995 - Effects of ochratoxin A upon early and late events in human T-cell proliferation. *Toxicology* 95: 45-50.

SUZUKI S. and SATOH T., 1973 - Effects of ochratoxin A on tissue glycogen levels in rats. *Japanese J. Pharmacol.* 23: 415-419.

SUZUKI S., KOZUKA Y., SATOH T. and YAMAZAKI M., 1975 - Studies on the nephrotoxicity of ochratoxin A in rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 34: 479-490

SUZUKI S., MOROI K., KANISAWA M. and SATOH T., 1986 - Effect of drug metabolizing enzyme inducers on carcinogenesis and toxicity of ochratoxin A in mice. *Toxicol. Lett.* (Suppl. 31): 206.

SZCZECH G.M., CARLTON W.W. and TUITE J., 1973a - Ochratoxicosis in beagle dogs. I Clinical and clinicopathological features. *Vet. Pathol.* 10: 135-154.

SZCZECH G.M., CARLTON W.W. and TUITE J., 1973b - Ochratoxicosis in beagle dogs. II. Pathology, *Vet. Pathol.* 10: 219-231.

TANCHEV Y. and DOROSSIEV D., 1991 - The first clinical description of Balkan endemic nephropathy (1956) and its validity 35 years later. *In* Mycotoxins, Endemic Nephropathy and Urinary Tract Tumours, Castegnaro M., Plestina R., Dirheimer G., Chernozemsky, I.N. and Bartsch H., eds. IARC Scientific publication, n° 115, pp. 21-28.

THACKER H.L. and CARLTON W.W., 1977 - Ochratoxin A mycotoxicosis in the guinea-pigs. *Food Cosmet. Toxicol.* 15: 563-574.

UENO Y., 1985 - Biotransformation of mycotoxins in the reconstituted cytochrome P-450 system. *Proc. Jpn. Assoc. Mycotoxicol.* 22: 28-30.

ULLRICH K.J., RUMRICH G., GEMBORYS M.W. and DEKANT W., 1991 - Renal transport and nephrotoxicity. *In:* Nephrotoxicity, P.H.Bach, N.J. Gregg, M. F. Wilks and L. Delacruz Eds. Dekker, London pp. 1-8.

VAN DER MERWE K.J., STEYN P.S. and FOURIE L., 1965a - Mycotoxins. Part II. The constitution of ochratoxin A, B and C, metabolites of *Aspergillus ochraceus* Wilh. *J. Chem. Soc.*: 7083-7088.

VAN DER MERWE K.J., STEYN P.S. FOURIE L. and THERON J.J., 1965b - Ochratoxin A, ■ toxic metabolite produced by *Aspergillus ochraceux* Wilh. *Nature*, London 205: 1112-1113.

VAN EGMOND H.P., 1991 - Worldwide regulations for ochratoxin A. In Mycotoxins, Endemic Nephropathy and Urinary Tract Tumours. Castegnaro M., Plestina R., Dirheimer G., Chernozemsky, I.N. and Bartsch H., eds. IARC Scientific publication, n° 115, pp. 331-336.

VUKELIC M., SOSTARIC ■. and FUCHS R., 1991 - Some pathomorphological features of Balkan endemic nephropathy in Croatia. *In* Mycotoxins, Endemic Nephropathy and Urinary Tract Tumours. Castegnaro M., Plestina R., Dirheimer G., Chernozemsky, I.N. and Bartsch H., eds. IARC Scientific publication, n° 115, pp. 37-42.

WEI Y.H., LU C.Y., LIN T.N., and WEI R.D., 1985 - Effect of ochratoxin A on rat liver mitochondrial respiration and oxidative phosphorylation. *Toxicology* 36: 119-130.

WIGER R. and STORMER F.C., 1990 - Effects of ochratoxins A and B on prechondrogenic mesenchymal cells from chick embryo limb buds. *Toxicol. Lett.* 54: 129-134.

Source : MNHN, Paris

MYCOFLORA OF HAIR, FEATHER AND FLOORING MATERIALS UNDER COWS AND CHICKENS AT QENA, EGYPT

S.M. MOHAWED*, S.I.I. ABDEL-HAFAZ, A.M. MOHARRAM
and Y.A. GHERBAWY*

Botany Department, Faculty of Science at Assiut
and *Qena Assiut University, Egypt

ABSTRACT - The mycological analysis of 60 samples of cow hair, layer-strains and broiler feather showed the high prevalence of *Aspergillus flavus*, *A. flavus* var. *columnaris*, *Chrysosporium indicum*, *Scopulariopsis brevicaulis* and *Paecilomyces variotii*. The common fungi in the flooring materials under cows and chickens included several species belonging to *Aspergillus*, *Emericella*, *Eurotium*, *Mucor*, *Penicillium*, *Rhizopus*, *Scopulariopsis*, *Chrysosporium* and others. The monthly fluctuations in the counts of total fungi in the flooring materials were almost irregular ranging from 16.6 to 183.3 colonies/mg dry sample.

INTRODUCTION

Fungi especially keratinophilic species have been found to contaminate feather, hair or other organs of birds and animals (Pugh & Evans, 1970; Hubalek, 1974, Aho, 1980, 1983; Bagy, 1986; Bagy & Abdel-Hafez, 1985 and others). Also there are many accounts of the prevalence of fungal propagules in the flooring material under poultry and animals. The flooring material may incorporate litter, faecal matter, dropping, dung, soil, keratinaceous substrates, food residues, etc. In U.K., Dennis & Gee (1983) found that *Paecilomyces variotii*, *Trichoderma* spp., *Aureobasidium pullulans* and *Hyalodendron lignicola* predominated in the fresh litter of broiler house but were replaced by *Scopulariopsis brevicaulis* and *Aspergillus* spp., in the final samples. In India, Sambyal *et al.* (1980) isolated 59 fungal isolates which included *Absidia* spp., *Aspergillus* spp., *Penicillium* spp. and *Curvularia* spp. Similar informations have also been reported by Lovett *et al.*, (1971); Ogundero (1979), Moharram *et al.* (1987), Bagy *et al.* (1989).

This investigation was designated to study the existence of keratinophilic fungi on cow hair and chicken feathers and to follow the monthly variations in the fungal populations of cows manure, layer strains and broiler litter inside the houses of these animals or chickens.

MATERIALS AND METHODS

I - Mycological analysis of hair and feather samples

a) Keratinophilic fungi

Twenty samples of each of cow hair, layer strains and broiler feather were collected from the cattles and chickens in Farms at Qena, Upper Egypt. Cow hair fragments or chicken feathers segments were scattered on sterile soil moistened with water to 40 % water holding capacity. Two plates were used for each samples which were incubated at 28°C for up to 16 weeks and the cultures were moistened with sterile distilled water whenever necessary. To confirm identification parts of fungal mycelium growing on hairs or feathers were transferred to Sabouraud's dextrose agar supplemented with chloramphenicol and cycloheximide (0.5 g/L for each).

b) Thermophilic and thermotolerant fungi:

Hair fragment or feathers were plated on the surface of yeast starch agar medium (Emerson, 1941). Two plates were used for each sample (two fragments per plate) which were incubated at 45°C. To avoid excessive loss of water plates were kept inside plastic bags and a jar filled with water was placed inside the incubator till the end of incubation period. After 7 days incubation, the growing fungi were identified and isolated.

II -Mycological analysis of cow manure an chicken litter

a) Mesophilic fungi: were isolated on glucose-Czapek's agar using the dilution plate method (Johnson & Curl, 1972) and the cultures were incubated at 28°C.

b) Keratinophilic fungi: were isolated using the hair baiting technique (Vanbreuseghem, 1952). Sterile cow hair fragments were plated on the surfaces of the manure or litter sample (about 50 gram sample per plate). Cultures were incubated at 28°C for 4 weeks after which the growing fungi were transferred onto Sabouraud's dextrose agar in order to purify and identify the keratinophilic and cycloheximide resistant moulds.

c) Thermophilic fungi: were isolated on yeast starch agar (Emerson, 1941) using the dilution plate method. Cultures were incubated at 45°C for 7 days after which fungi were identified and counted.

III - Determination of some physicochemical characteristics of the flooring materials

The moisture content of the monthly samples of the different flooring materials was determined by the percentage loss in weight of 100 g fresh sample after dryness at 105°C for 24 hours. The total soluble salts were determined by shaking a known weight of sample (on dry weight basis) in a known volume of water for 1 hour, samples were filtered and the filtrate was dried at 105°C. The dry residue was weighed and calculated as percentage soluble salts.

The pH values were determined using a pH meter (Orior Research model 601 T digitalionalizer).

RESULTS AND DISCUSSION

I - Hair and Feather fungi

a) Keratinophilic fungi

Forty species and 1 variety of keratinophilic and cycloheximide resistant fungi representing 17 genera were collected from cow hairs (10 genera, 16 species and 1 variety), layer strains (11 genera, 19 species and 1 variety) and broiler feathers (16 genera, 23 species and 1 variety) as shown in Table 1.

Aspergillus was the most common genus on all samples, being covered from 50%, 100% and 90% of cow hairs, layer strains and broiler feathers respectively. Of the 7 *Aspergillus* species *A. flavus, A. flavus* var. *columnaris* were generally the most common. Other *Aspergillus* species such as *A. niger, A. ochraceus, A. parasiticus, A. sydowii, A. tamarii* and *A. versicolor* were less frequently isolated. The above *Aspergillus* species have been reported to be recovered from hairs of camel, cow, donkey and goat in Egypt (Bagy & Abdel-Hafez, 1985; Bagy, 1986) from goat and sheep hairs in Gaza strip (Abdel-Hafez, 1987), from hair of cows, donkeys, goats, rabbits, cats and dogs from the west bank of Jordan (Ali Shtayeh *et al.*, 1988 a, b).

Chrysosporium was also prevalent on the hair and feather samples being recovered from 55%, 100% and 65% of cow hair, layer strains and broiler feathers respectively. Of the 4 species of *Chrysosporium, C. indicum* was the most common on feathers of layer strains (65 % of the samples) and broiler (85 %). *C. tropicum* occurred in low to moderate incidences (15-25 % of the samples) while *C. keratinophilum* and *C. pannorum* were less frequently isolated from one or two types of substrate. These *Chrysosporium* species were previously recovered from animals and birds in Egypt (Bagy & Abdel-Hafez, 1985; Bagy, 1986; Moharram *et al.*, 1989); Johdan (Ali Shtayeh *et al.*, 1988a, b), as well as from mammals in Czechoslovakia (Otcenasek and Dvorak, 1962), Germany (Hoffmann *et al.*, 1970. India (Gugnani *et al.*, 1975) and Venezuela (Moraes *et al.*, 1967) and others countries.

Scopulariopsis was recovered from 60%, 20% and 50% of cow hair, layer strains and broiler feathers respectively. It was represented by 4 species of which *S. brevicaulis* was more frequently isolated than the others (15-50% of the samples). Several authors have reported the common existence of *S. brevicaulis* on hairs of mammals (Bagy & Abdel-Hafez, 1985; Abdel-Hafez, 1986; Ali-Shtayeh *et al.*, 1988 a, b, 1989). The remaining *Scopulariopsis* species such as *S. brumptii, S. candida* and *S. koningii* were less common in this work of Ali-Shtayeh *et al.*, 1988 a, b).

Penicillium was moderately recovered from 25-45% of the samples and was represented by 6 species namely *P. aurantiogriseum, P. chrysogenum, P. citrinum, P. jenseni, P. funiculosum* and *P. purpurogenum.* Each of these species occurred on 1-4 samples of one type or more of the three types of keratinaceous materials.

Table 1 - Number of cases of isolation (NCI, out of 20 samples) and occurrence remarks (OR) of keratinophilic fungi recovered from cow hair, layer strains and broiler feather samples on Sabouraudd's dextrose agar at 25°C.

Genera and species	Cow hair	Layer strains feather	Broiler feather
	NCI & OR	NCI & OR	NCI& OR
Acremonium strictum W. Gams	4 L	-	2 R
Aspergillus	10 H	20 H	18 H
A. flavus Link	6 M	4 L	10 H
A. flavus var. *columnaris* Raper & Fennell	3 L	19 H	11 H
A. niger Van Tieghem		5 M	-
A. ochraceus Wilheim		-	1 R
A. parasiticus Speare		3 L	-
A. sydowii (Bain. & Sart.) Thom & Church		-	1 R
A. tamarii Kita		5 M	1 R
A. versicolor (Vuill.) Tiraboshi	4 L	-	-
Chaetomium globosum Kunze	-	10 H	2 R
Chrysosporium	11 H	20 H	13 H
C. indicum (Randhawa & Sandhu) Garg	1 R	17 H	13 H
C. keratinophilum (Frey) Carmichael	3 L	-	-
C. pannorum (Link) Hughes	2 R	3 L	-
C. tropicum Carmichael	5 M	3 L	4 L
Cunninghamella	-	2 R	4 L
C. echinulata Thaxter	-	1 R	4 L
C. elegans Lender	-	1 R	-
Fusarium	2 R	-	4 L
F. dimerum Penz.	-	-	1 R
F. oxysporum Sheldon	2 R	-	-
F. solani (Mart.) Sacc.	-	-	3 L
Geotrichum candidum Kink.	1 R	-	1 R
Gliocladium roseum Bainier	-	-	3 L
Mucor	2 R	3 L	3 L
M. circinelloides Van Tieghem	2 R	-	2 R
M. hiemalis Wehmer	-	-	1 R
M. racemosus Fresenius	-	3 L	-
Paecilomyces	2 R	1 R	-
P. inflatus (Burnside) Carmichael	2 R	-	-
Paecilomyces sp.	-	1 R	-
Penicillium	5 M	9 M	7 M
P. aurantiogriseum Diercky	-	5 M	-
P. chrysogenum Thom	5 M	2 R	-
P. citrinum Thom	-	3 L	1 R
P. funiculosum Thom	-	-	4 L
P. jensenii Zaleski	-	1 R	-
P. purpurogenum Stoll	-	-	2 R
Rhizopus stolonifer (Ehrenb.) Lind.	-	-	4 L
Scopulariopsis	12 H	4 L	10 H
S. brevicaulis (Sacc.) Bainier	3 L	4 L	10 H
S. brumptii Salvanet-Duval	6 M	-	-
S. candida (Gueguem) Vuillemin	1 R	-	-
S. koningii (Oud.) Vuillemin	10 H	-	-
Syncephalastrum racemosum (Cohn) Schroeter	-	2 R	3 L
Trichophyton mentagrophytes (Robin) Blanchard	-	-	2 R
Trichothecium roseum (Pers.) Link	-	1 R	-
Tritirachium aryzae Van Beyma	-	-	1 R
Sterile mycelia (white & dark colour)	2 R	1 R	1 R

Trichophyton mentagrophytes which appeared in rare incidence (10 % of broiler feather samples) in this work was previously reported to be common on the hair of some mammals in West Bank of Jordan (Ali-Shtayeh *et al.*, 1988 a, b).

The remaining genera and species listed in Table 1, were less frequently isolated from one type or more of the keratinaceous materials.

b) Thermophilic and thermotolerant fungi

Nine species belonging to 8 genera were recovered from cow hairs (5 genera and 5 species), layer strains (7 genera and 7 species) and broiler feathers (8 genera and 8 species) using yeast - starch agar at 45 °C as shown in Table 2.

Table 2 - Numbers of cases of isolation of thermophilic and thermotolerant fungi recovered from the flooring materials and keratinaceous substrates of cow and chickens on yeast starch agar at 45°C.

Genera and Species	Flooring materials (24 samples)			Keratinaceous substrates (20 samples)		
	Cow manure	Layer strains litter	Broiler litter	Cow hair	Leather strains feather	Broiler feather
Aspergillus	23	24	24	20	17	16
A. flavus Link	16	12	14	-	-	-
A. fumigatus Fresenius	20	21	23	20	17	16
A. niger Van Tieghem	15	14	16	-	-	-
A. sydowii (Bain. & Sart.) Thom & Church	-	-	1	-	-	-
A. terreus Thom	19	19	21	-	-	3
Emericella	18	17	21	9	4	7
E. nidulans (Eidam) Vuillemin	15	17	19	9	4	7
E. quadrilineata (Thom & Raper) Benjamin	11	12	[illegible]	-	-	-
Malbranchea sulfurea (Miehe) Siger & Carmichael	7	-	6	-	-	-
Mucor racemosus Fresenius	4	10	4	15	9	14
Paecilomyces	5	12	6	4	9	[illegible]
P. humicola Onions & Barron	[illegible]	-	-	-	-	-
P. variotii Bain	-	12	6	4	9	8
Rhizomucor pusillus (Lindt) Schipper	20	22	24	6	18	17
Rhizopus	14	15	6	-	4	12
R. rhizopooliformis (Cohn) Zopf	-	15	6	-	4	12
R. stolonifer (Ehrenb.) Lindt	14	7	-	-	-	-
Thermomyces lanuginosus Tsiklinsky	12	11	15	-	2	10

Aspergillus was the most prevalent genus being recovered from 80-100% of the keratinaceous materials. *A. fumigatus* (80-100% of the samples) and *A. terreus* (15% of broiler feather) were the two representative species of *Aspergillus*. Other thermotolerant fungi were also isolated from the three substrates and these were *Emericella nidulans*, *Mucor racemosus* and *Paecilomyces variotii*.

Truly thermophilic fungi such as *Malbranchea sulfurea*, *Rhizomucor pusillus*, *Rhizopus rhizopodiformis* and *Thermomyces lanuginosus* were commonly isolated from the keratinaceous materials. Most of these species were also found to contaminate human and buffalo hairs incubated at 45°C (Moharram *et al.*, 1989).

Table 3 - Moisture content (MC), total soluble salts (TSS), pH values, total counts (TC) of mesophilic fungi and number of fungal species (NS) estimated in the monthly samples of flooring materials under cows and chickens during the period from January to December 1988.

Months	Cow manure					Layer strain litter					Broiler litter				
	MC	TSS	PH	ATC	NS	MC	TSS	PH	ATC	NS	MC	TSS	PH	ATC	NS
January	11.5	0.12	9.2	73.0	18	18.5	0.17	7.1	183.3	21	4.5	0.17	7.4	91.0	28
February	10.5	0.32	9.1	87.7	19	23.0	0.17	7.5	144.0	23	8.0	0.29	7.9	126.3	30
March	26.6	0.32	9.2	37.0	7	13.5	0.17	7.5	97.7	7	3.5	0.17	7.5	139.0	17
April	20.0	0.20	9.0	65.5	10	20.0	0.07	7.5	118.8	9	7.0	0.17	7.8	95.0	14
May	25.0	0.40	9.1	41.8	9	23.0	0.09	7.5	166.0	21	7.5	0.27	6.6	142.5	24
June	13.5	0.28	9.0	52.8	14	20.0	0.17	7.0	33.5	10	8.0	0.29	6.8	120.7	11
July	15.5	0.20	8.4	16.5	7	22.0	0.13	7.9	18.3	11	9.0	0.33	7.2	85.7	11
August	22.0	0.12	8.1	52.2	7	18.0	0.17	7.6	44.7	19	10.5	0.27	7.1	57.7	11
September	23.0	0.32	8.7	85.7	9	15.0	0.30	7.7	63.5	15	7.0	0.17	6.6	133.3	12
October	18.0	0.36	8.4	27.3	9	17.0	0.23	7.5	40.7	13	5.0	0.17	7.0	27.3	[illegible]
November	15.0	0.20	8.6	43.2	14	25.0	0.07	8.0	68.1	18	8.0	0.27	8.3	85.8	16
December	23.0	0.28	8.7	58.2	13	21.5	0.27	8.0	106.2	19	11.0	0.07	8.5	113.7	27

II - Monthly fluctuations of fungi in cow manure and chicken litter

a) Physicochemical characteristics of the flooring materials (Table 3)

The moisture content was relatively high in cow manure and layer strains litter ranging from 10.5-26.6% and 13.5-25% respectively. Broiler litter contained lower quantities of moisture ranging from 3.5-11%. The total soluble salts was generally low in the different flooring materials varying from 0.07-0.4%. The pH values were always in the alkaline side in case of cow manure (8.1-9.2) and around neutrality or alkalinity in chicken litter (6.6-8.5). No marked correlation between the changes in the physicochemical characteristics of the flooring material and the monthly fungal counts or the number of species of either mesophilic or thermophilic fungi.

b) Mesophilic fungi

With reference to the data in table 4 it could be observed that fifty three species and 2 species varieties appertaining to 20 genera were collected during the period from January to December 1988 from cow manure (11 genera, 27 species and 1 variety), layer strains (15 genera, 36 species and 2 varieties) and broiler litter (15 genera, 35 species and 2 varieties). The monthly total counts of fungi (Fig. 1) showed generally irregular fluctuations varying from 16.5-87.7, 18.3-183.3 and 27.3-142.5 colonies/mg dry sample and the highest counts were estimated during February, January and May in cow manure, layer strains and broiler litter respectively. The most common genera on manure and litter were *Aspergillus, Emericella, Eurotium, Fusarium, Mucor, Penicillium, Rhizopus* and *Scopulariopsis*. The monthly counts of these genera did not show any regular fluctuations. Working with broiler litter Lovett *et al.* (1971) found that *Penicillium* and *Scopulariopsis* were common while *Fusarium, Aspergillus* and *Mucor* were less frequent. Most of the above genera were previously recovered with variable densities from faecal samples of cattle and poultry from some Egyptian Governorates (Lotfi *et al.*, 1986; Sobih *et al.*, 1986; El-Badry & Sokkar, 1988). From the above genera, the most frequent species were *Aspergillus flavus, A. flavus* var. *columnaris, A. fumigatus, A. niger, A. sydowii, A. terreus, A. versicolor, Emericella nidulans, Eurotium amstelodami, E. chevalieri, Mucor plumbeus, M. racemosus, Penicillium aurantiogriseum, P. oxalicum, Rhizopus stolonifer* and *Scopulariopsis brevicaulis*. The monthly variation in the counts of these species were generally of irregular pattern and were almost similar to their respective genera. In addition to the above species other fungal species were found to be more frequent on one or two types of the flooring materials and these were *Botryotrichum piluliferum, B. atrogriseum, Cladosporium cladosporioides, C. herbarum, Mucor circinelloides, Penicillium funiculosum, P. duclauxi, P. variabile, P. janczweskii, Scopulariopsis koningi, S. candida, Aspergillus ochraceus, A. tamarii, Phoma glomerata, Fusarium moniliforme, F. solani* and *Paecilomyces variotii* (Table 4). Most of the above species were frequently encountered from the faecal material or droppings of cattle and poultry in samples collected from Assiut, Sohag and Qena Governorates, Upper Egypt (Lotfi *et al.*, 1986; Sobih *et al.*, 1986; Moharram *et al.*, 1987 and El-Badry and Sokkar, 1988). In U.K., Dennis and Gee (1973) found that the most common fungi of broiler house litter were *Aspergillus sydowii, A. versicolor, A. repens, A. amstelodami, A. ruber, A. chevalieri, A. flavus, A.*

	Cow manure	Layer strains litter	Broiler litter
Genera and species	NCI & OR	NCI & OR	NCI& OR
Absidia corymbifera (Cohn) Sacc.	-	4 L	-
Acremonium strictum W. Gams	-	-	4 L
Alternaria alternata (Fries) Keissler	1 R	4 L	7 M
Aspergillus	24 H	24 H	24 H
A. candidus Link	2 R	-	-
A. carneus (V. Tiegh.) Blochwitz	-	-	-
A. flavus Link	20 H	22 H	23 H
A. flavus var. *columnaris* Raper & Fennell	8 M	8 M	7 M
A. fumigatus Fresenius	12 H	17 H	20 H
A. niger Van Tieghem	23 H	23 H	22 H
A. ochraceus Wilhelm	3 L	-	6 M
A. parasiticus Speare	5 L	5 L	10 M
A. sydowii (Bain. & Sart.) Thom & Church	5 L	10 M	10 M
A. tamarii Kita	-	-	8 M
A. terreus Thom	12 H	4 L	15 H
A. terreus var. *africanus* Fennell & Raper	-	3 L	-
A. versicolor (Vuill.) Tiraboschi	5 L	7 M	11 M
A. wentii Wehmer	3 L	-	-
Botryotrichum	-	10 M	6 M
B. atrogriseum Van Beyma	-	-	6 M
B. piluliferum Sacc. & March.	-	10 M	-
Chaetomium globosum Kunze	-	1	-
Circinella muscae (Sorok) Berl & Detoni	5 L	-	-
Cladosporium	-	7 M	-
C. cladosporioides (Fres) De Vries	-	7 M	-
C. herbarum (Pers) Link	-	7 M	-
Emericella	4 L	10 M	7M
E. nidulans (Eidam) Vuillemin	4 L	10 M	6 M
E. nidulans var. *lata* (Thom & Raper) Subram.	-	-	8 L
Eurotium	6M	4 L	9 M
E. amstelodami Mangin	5 L	4 L	8 M
E. chevalieri Mangin	2R	3 L	4 L
Fusarium	3 L	16 H	18 H
F. equiseti (Corda) Sacc.	-	4 L	-
F. moniliforme Shelon	2 R	9 M	7 M
F. solani (Mart.) Sacc.	1 R	8 M	11 M
F. tabacinum (Beyma) W. Gams	-	4 L	-
Mucor	15 H	15 H	18 H
M. circinelloides Van Tiegh.	-	8 M	3 L
M. plumbeus Bonord	6 M	7 M	7 M
M. racemosus	11 M	7 M	17 H
Paecilomyces variotii Bain.	1 R	7 M	9 M
Penicillium	19 H	21 H	18 H
P. aurantiogriseum Dierckx	3 L	7 M	12 H
P. brevicompactum Dierckx	-	-	5 L
P. chrysogenum Thom	19 H	16 H	17 H
P. duclauxii Delacroix	-	-	7 M
P. funiculosum Thom	-	7 M	-
P. janczewskii Zaleski	-	8 M	7 M
P. oxalicum Currie & Thom	13 H	7 M	9 M
P. rugulosum Thom	5 L	-	4 L
P. sublateritium Biourge	-	2 R	-
P. variabile Sopp	-	-	7 M
Phoma glomerata (Corda) Wollen. & Hochap.	-	-	6 M
Rhizopus	17 H	17 H	15 H
R. rhizopodiformis (Cohn) Zopf	-	-	3 L
R. stolonifer (Ehrenb.) Lind	17 H	17H	15 H
Scopulariopsis	6 M	19 H	19 H
S. brevicaulis (Sacc.) Bainier	6 M	18 H	16 H
S. brumptii Salvanet Duval	1 R	-	-
S. candida (Gueguem) Vuillemin	-	6 M	8 M
S. koningii (Oud.) Vuillemin	-	8 M	-
Syncephalastrum racemosus (Cohn) Schroeter	-	4 L	-
Thamnostylum sp.	-	-	5L
Trichoderma harzianum Rifai	-	-	3 L

Table 4 - Average total counts (ATC, colonies/mg dry manure or litter in all samples), number of cases of isolation (NCI, out of 24 samples) and occurrence remarks (OR) of fungal genera and species recovered from cow manure, layer strains and broiler litters on glucose-Czapek's agar at 28°C.
Occurrence remarks: H= high occurrence, isolated from 12-14 cases (out of 24); M = moderate occurrence, from 6-11 cases; L = low occurrence, from 3-5 cases; R = rare occurrence, 1 or 2 cases.

---

candidus, Scopulariopsis brevicaulis, Paecilomyces variotii, Penicillium crustosum and *Absidia cylindrospora.*

c) Keratinophilic fungi

Twenty species and 1 variety representing 9 genera were collected from the monthly samples of cow manure and chicken litter (Table 5). *Chrysosporium* was the most common genus occurring in 10-12 months. Of the 6 *Chrysosporium* species *C. indicum* and *C. tropicum* were the most prevalent which occurred in 12.5-50 % of the

Table 5 - Number of cases of isolation (NCI, out of 12 samples), and occurrence remarks (OR) or keratinophilic fungi recovered from each of cow manure, layer strains and broiler litters baited with cow hair fragments [redacted] 25°C.

Genera and species		Chicken litters	
	Cow manure	Layer strains	Broiler
	NCI & OR	NCI & OR	NCI & OR
Acremonium	3M	-	1 R
A. strictum W. Gams	3 M	-	-
Acremonium sp.	-	-	1 R
Aspergillus	3 M	-	10 H
A. flavus Link	2 L	-	6 H
A. flavus var. *columnaris* Raper & Fennell	1 R	-	-
A. fumigatus Fresenius	-	-	6 H
A. terreus Thom	-	-	8 H
Chrysosporium	12 H	12 H	10 H
C. carmichaelii Van Oorschot	-	-	6 H
C. indicum (Randhawa & Sandhu) Garg	8 H	4 M	3 M
C. keratinophilum (Frey) Carmichael	1 R	-	3 M
C. pannorum (Link) Hughes	2 L	-	-
C. queenslandicum Apinis & Rees	4 M	-	-
C. tropicum Carmichael	10 H	12 H	6 H
Emericella nidulans (Eidams) Vuill.	-	-	2 L
Gymnoascus reticulatus Zukal	-	-	1 R
Microascus trigonosporus Emmons et Dod.	1 R	-	-
Penicillium	2 L	3 M	1R
P. aurantiogriseum Dierckx	2 L	-	-
P. funiculosum Thom	-	3 M	1 R
Thermoascus aurantiacus Miehe	1 R	-	-
Scopulariopsis	2 L	6 H	2 L
S. brevicaulis (Sacc.) Bainier	-	-	2 L
S. brumptii Salvanet-Duval	-	6 H	-
S. koningii (Oud.) Vuill.	2 L	-	-
Sterile mycelia (dark colour)	-	-	1R

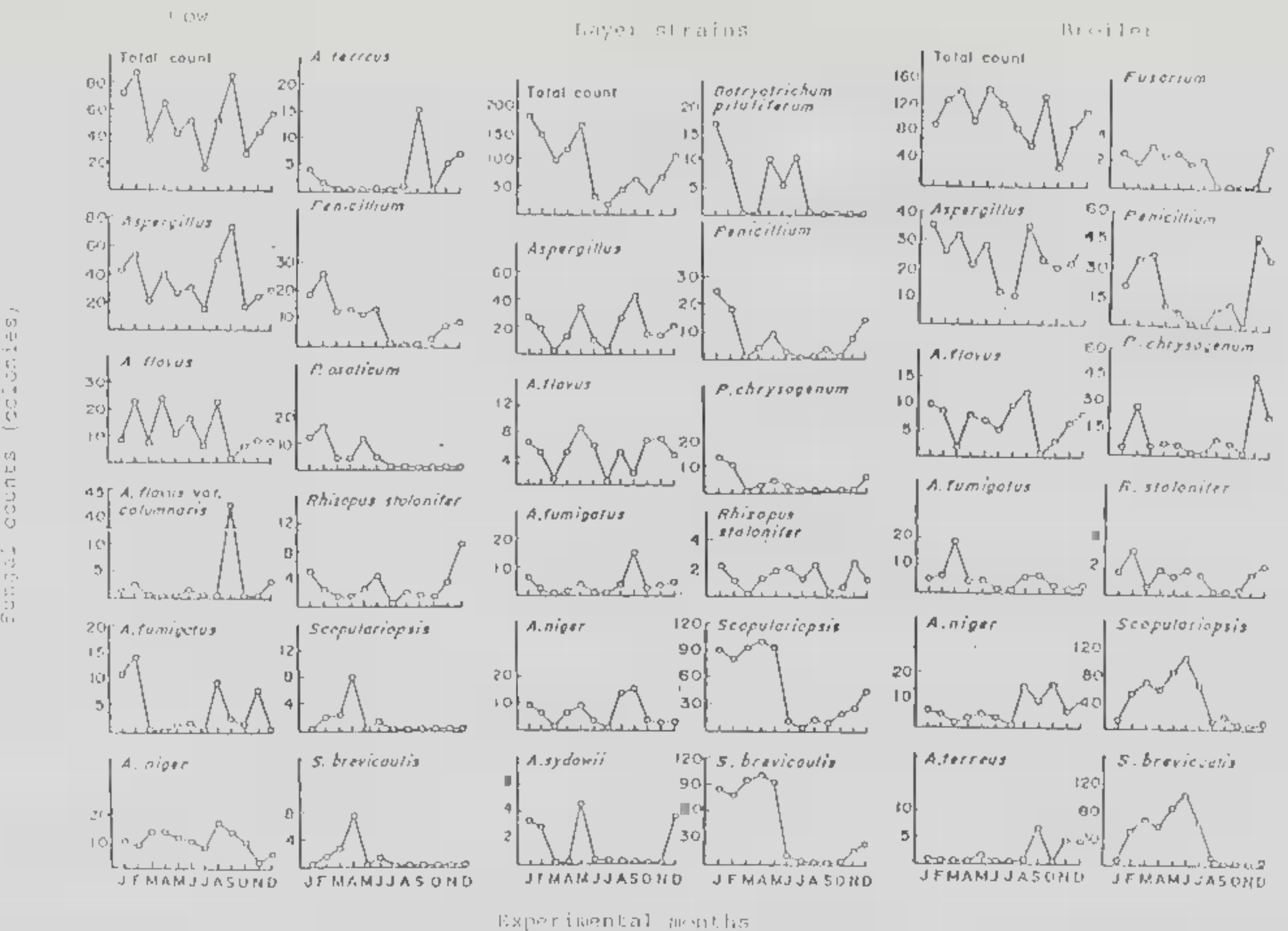


Fig. 1 - Monthly counts (colonies/mg dry sample) of mesophilic fungi recovered from the flooring materials under cows and chickens during the period from January to December 1988.

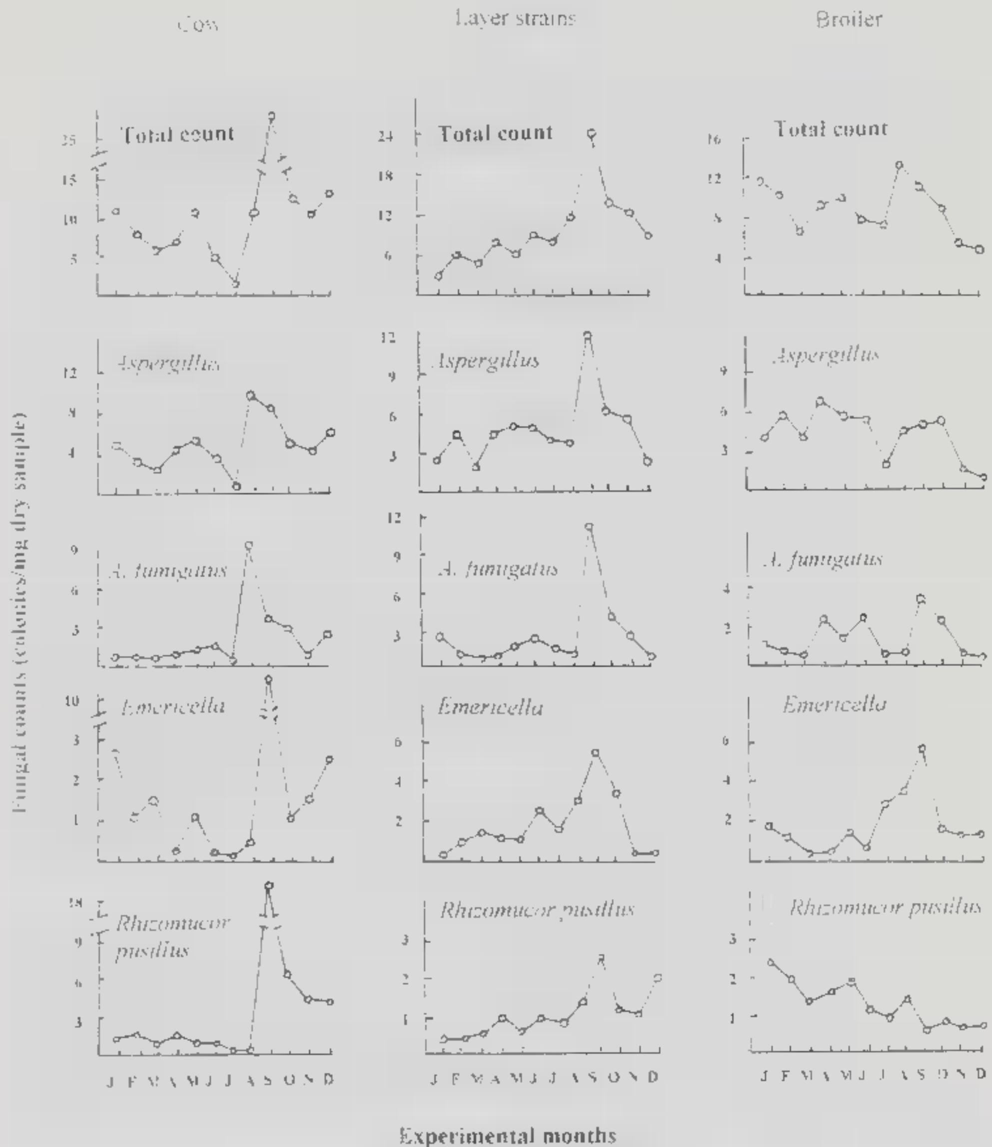


Fig. 2 - Monthly counts (colonies/mg dry sample) of common thermophilic and thermotolerant fungi recovered from the flooring materials under cows and chickens during the period from January to December 1988.

samples. The remaining *Chrysosporium* species appeared in one or two types of the flooring materials such as *C. carmichaelii* from broiler litter, *C. queenslandicum* from cow manure, *C. keratinophilum* from cow manure and broiler litter. Some of these

species were previously encountered from animal and bird pens in Egypt (Bagy *et al.*, 1989).

Numerous cycloheximide resistant fungal species appeared also in the isolation plates as those belonging to *Acremonium, Aspergillus, Emericella, Gymnoascus, Microascus, Penicillium, Thermoascus, Scopulariopsis* and sterile mycelia.

d) Thermophilic and thermotolerant fungi

Sixteen species belonging to 9 genera were identified during the experimental period which extended from January to December 1988 (Table 6). The monthly counts of total fungi (Fig. 2) were irregularly fluctuating between 1.4-38.8, 3.4-25.2 and 4.5-13.1 colonies/mg dry sample with the highest counts being recorded during August and September 1988.

Aspergillus, Mucor, Paecilomyces and *Rhizopus* were frequently encountered from the three substrates. Of these genera, the common species were *A. flavus, A. fumigatus, A. niger, A. terreus, Emericella nidulans, E. quadrilineata, Mucor racemosus, Paecilomyces humicola, P. variotii* and *Rhizopus stolonifer*. The monthly counts of each of these species did not show any regular fluctuations and some of them appeared intermittently during the experimental period. *Malbranchea sulfurea, Rhizomucon pusillus, Rhizopus rhizopodiformis* and *Thermomyces lanuginosus* appeared also intermittantly in the monthly samples of cow manure, layer strains and broiler litter. Most of these thermotolerant and thermophilic fungi were reported to be recovered from dung and manure (Cooney & Emerson, 1964; Seal & Eggins, 1972; Minoura *et al.*, 1973) and from poultry droppings (Ogundero, 1979).

From the previous results and discussion it could be concluded that the cows hair, the chickens feather and the flooring materials inside houses of these animals or birds are heavily contaminated with propagules of several saprophytic and pathogenic moulds. The pathogenicity of several fungal species such as *Trichophyton mentagrophytes, A. fumigatus, A. flavus, E. nidulans, Scopulariopsis brecaulis* to animals, birds and even to man has been reported by several authors (Onsberg, 1980; Velez and Diaz, 1985) and others.

It is therefore advisable to reduce these pathogenic moulds inside cattle and chicken houses either by continuous cleaning and good aeration or by using suitable disinfectants and antifungal agents. Also, all workmen in the cattle or poultry houses should be advised to follow the hygienic precautions to avoid infection by the harmful fungi.

REFERENCES

ABDEL-HAFEZ A.I.I., 1987 - Survey on the mycoflora of goat and sheep hairs from Gaza strip. *Bull. Fac. Sci. Assiut Univ.* 16 (1): 15-21.

AHO R., 1980 - Studies on fungal flora in hair from domestic and laboratory animals suspected of dermatophytosis. I - Dermatophytes. *Acta. Path. Microb. Scend.* Sect. B 88: 79-83.

AHO R., 1983 - Saprophytic fungi isolated from the hair of domestic and laboratory animals with suspected dermatophysis. *Mycopath.* 83: 65-73.

ALI-SHTAYEH M.S., ARDA H.M., HASSOUNA M. and SHAHEEN S.F., 1988 - Keratinophilic fungi on the hair of goats from the West Bank of Jordan. *Mycopath.* 104: 103-108.

ALI-SHTAYEH M.S., ARDA H.M., HASSOUNA M. and SHAHEEN S.F., 1988 b - Keratinophilic fungi on the hair of cows, donkeys, rabbits, cats and dogs from the West Bank of Jordan. *Mycopath.* 104: 109-121.

ALI-SHTAYEH M.S., ARDA H.M., HASSOUNA M. and SHAHEEN S.F., 1989 - Keratinophilic fungi on sheep hairs from the West Bank of Jordan. *Mycopath.* 105.

BAGY M.M.K., 1986 - Fungi on the hair of large mammals in Egypt. *Mycopath.* 93 (2): 73-75.

BAGY M.M.K. and ABDEL-HAFEZ A.I.I., 1985 - Mycoflora of camel and goat hairs from Al-Arish, Egypt. *Mycopath.* 92: 125-128.

BAGY M.M.K., ABDEL-MALLEK A.Y. and MOHARRAM A.M., 1989 - Keratinophilic fungi of animal and bird pens in Egypt. *J. Basic Microbiol.* 29 (6): 327-335.

COONEY D.G. and EMERSON R., 1964 - Thermophilic fungi, Eumycota, San Francisco, W.H. Freeman. Publ. Co. (pp. 188).

DENNIS C. and GEE J.M., 1973 - The microbial flora of broiler-house litter and dust. *J. Gen. Microbiol.* 78: 101-107.

EL-BADRY A.A. and SOKKAR I.M., 1988 - Mycotic flora of chicken population in kena Governorate. *Assiut Vet. Med. J.* 19 (38): 174-182.

EMERSON R., 1941 - An experimental study of the life cycles and taxonomy of *Allomyces*. *Lloydia* 4: 77-144.

GUGNANI H.G., WATTAL B.L. and SANDHU R.S., 1975 - Dermatophytes and other keratinophilic fungi recovered from small mammals in India. *Mykosen* 18: 529-538.

HOFFMANN R., KOLIPP D. and KOCH H.A., 1970 - Die Bedeutung von Mousen und anderen Kleinsaugern fur die verbreitung von Dermatophyten und anderen Keratinophilen Pilzen. *Mykosen* 13: 353-387.

HUBALEK Z., 1974 - Fungi associated with free-living birds in Czechoslovakia and Yugoslavia. Acta Scientiarum Naturalium Academiae Scientiarum Bohemoslovacae Bron ■: 1-62.

JOHNSON L.F. and CURL E.A., 1972 - Method for research on ecology of soil-borne pathogens. Burgress Publ. Co. Minneapolis, 247 pp.

LOVETT J., MESSER W.W. and READ R.B., 1971 - The microflora of Southern Ohio poultry litter. *Poult. Sci.* 50: 746-751.

MINOURA K., OCHI K. and NEHIRA T., 1973 - Thermophilic filamentous fungi in Japan (2). *Trans. Br. Mycol. Soc.* 14: 362-367.

MOHARRAM A.M., BAGY M.M.K. and ABDEL-MALLEK A.Y., 1987 - Saprophytic fungi isolated from animal and bird pens in Egypt. *J. Basic. Microbiol.* 27 (7): 361-367.

MOHARRAM A.M., MAGHAZY S.M. and EL-KATATNY M.S., 1989 - Incidence of saprophytic and keratinolytic fungi on healthy buffalo hair and their relation to soil. *Bull. Fac. Sci., Minia* 55 (9): 173-179.

MORAES M., BORELLI D. and FEO M., 1967 - Microsporum amazonicum nova species. *Med. Cutan.* 2: 281-286.

OGUNDERA V.W., 1979 - Thermophilic and thermotolerant fungi in poultry droppings in Nigeria. *Journal of General Microbiol.* 115: 253-254.

ONSBERG P., 1980 - *Scopulariopsis brevicaulis* in nails. *Dermatologica* 161: 259-264.

OTCENASEK M. and DVORAK J., 1962 - The isolation of *Trichophyton terrestre* and other keratinophilic fungi from small mammals of South Eastern Moravia. *Sabouraudia* 2: 111-113.

PUGH G.J.F. and EVANS M.O., 1970 - Keratinophilic fungi associatied with birds. I - Fungi isolated from feathers , nests and soils. *Trans. Brit. Mycol. Soc.* 54: 233-240.

SAMBYAL D.S., BAXI K.K. and KATCOH R.C., 1980 - A study of mycoflora of hatcheries. *Mykosen* 24 (5): 313-317.

SEAL K.J. and EGGINS H.O.W., 1972 - The role of microorganisms in the biodegradation of farm animal wastes with particular reference to intensively produced wastes. A review. *Int. Biodeterior. Bull.* 8: 95-100.

VAUBREUSEGHEM R., 1952 - Biological technique for the isolation of dermatophytes from soil. *Ann. Soc.Belge. Med. Trop.* 32, 173.
VELEZ H. and DIAZ F., 1985 - Onychomycosis due to saprophytic fungi. *Mycopath.* 91: 87-92.

ANALYSES BIBLIOGRAPHIQUES

A. MAUBLANC - **Champignons comestibles et vénéneux.**

Paru en 1921 sous le titre de *Champignons de France*, les *Champignons comestibles et vénéneux* du mycologue André Maublanc sont édités de nouveau sous leur forme première d'un volume d'aquarelles accompagnées de la description des espèces.

Les connaissances sur les champignons s'étant considérablement développées au fil des années, une remise à jour était devenue indispensable. Cette nouvelle édition garde les qualités essentielles qui ont fait la réputation du "Maublanc" mais elle présente les dénominations scientifiques actuelles des espèces comestibles et vénéneuses que l'on voit communément en France et dans les pays d'Europe occidentale. Tout en mentionnant les anciennes appellations - pour faciliter les comparaisons bibliographiques -, elle tient compte en effet des genres nouveaux délimités au cours des dernières décennies et s'est référée aux règles établies par le Code international de nomenclature botanique.

Aidé par un glossaire qui donne les explications nécessaires à la compréhension des principaux termes utilisés en mycologie, le lecteur pourra, grâce aux descriptions détaillées complétant les aquarelles des champignons et les dessins des spores, identifier près de 350 espèces. Pour les champignons vénéneux mortels plus particulièrement, il trouvera signalées les caractéristiques à observer pour éviter les confusions avec certains champignons comestibles.

Guide de terrain consulté avec profit par le débutant, aide-mémoire pour l'amateur éclairé comme pour le mycologue professionnel, cette édition renouvelle en outre les recommandations de prudence concernant la cueillette et la consommation des champignons.

PLOETZ R.C., ZENTMYER G.A., NISHIJIMA W.T., ROHRBACH K.G. & OHR H.D., 1994. - **Compendium of Tropical Fruit Diseases. The Disease Compendium Series of the American Phytopathological Society**. APS Press, 3340 Pilot Knob Road, St. Paul, Minnesota, 55121-2097, USA, 88 pp.

Ce 28ème numéro de cette série (la liste des ouvrages parus est reproduite sur le dos de la couverture) s'inscrit dans la lignée des précédents : qualité exceptionnelle du support papier, de présentation et d'édition du texte; en particulier, une iconographie abondante, surtout polychrome, qui a d'ailleurs fait la renommée de la série. Les document photographiques reproduits [redacted] singularisent comme toujours, par une fidélité marquée du sujet traité, signe d'une sélection rigoureuse. Ce numéro s'individualise cependant par le nombre important de ses éditeurs et de celui des spécialistes sollicités pour la rédaction des textes couvrant les diverses affections traitées; ceci est en relation avec le titre de ce numéro. Recommander ce document serait superflu, eu égard à la qualité scientifique du texte proposé, émanant des spécialistes les plus importants dans leur domaine respectif à l'échelle internationale.

L'ouvrage se compose de six sections traitant respectivement des productions agricoles tropicales suivantes : les bananes, les noix de coco, les mangues, les ananas, les papayes et les avocats. Chacune de ces productions est importante du point de vue économique dans un territoire tropical particulier. On note cependant avec étonnement que la production mondiale annuelle des bananes, comparativement la plus marquée, ne représente que le double de celle des noix de coco, proche de quarante mille tonnes. Il en résulte qu'une connaissance approfondie des affections concernant ces productions tropicales, permet une politique adéquate de lutte contre les pertes occasionnées par les divers agents infectieux.

Un même plan d'ensemble est suivi dans chaque section. Après une courte introduction descriptive de la plante cultivée, sont abordées dans le détail les maladies induites par des champignons, des bactéries, des virus et des nématodes. Il est évident que les agents microbiens et les nématodes incriminés varient selon l'hôte considéré. Chaque section de l'ouvrage comporte plusieurs chapitres. Chacun de ces derniers a été rédigé par un auteur différent et parfois plusieurs spécialistes se sont associés pour un même chapitre. Ceci explique l'importance numérique des participants ayant contribué à la rédaction de cet ouvrage. Celui-ci se termine par un index de quatre pages comportant chacune trois colonnes de texte; le contenu de cet index reflète la densité des mots-clefs cités dans le texte et interdit toute possibilité d'analyse objective de l'ensemble des thèmes abordés.

La parution de ce compendium sur les affections des productions agricoles tropicales, économiquement les plus importantes, répond à une longue attente exprimée par les agriculteurs, phytopathologistes, producteurs de semences et autres catégories de personnes, impliqués dans la production et la commercialisation de ces fruits à haute valeur marchande. Ceci explique le mode particulier d'organisation de ce numéro et la densité des participants. Sa parution satisfait donc à un besoin actuel de ces agents économiques, puisqu'il met à leur disposition des informations actualisées et rigoureuses, sur les thèmes traités.

J. Mouchacca

READ D. J., LEWIS D. H., FITTER A. H. & ALEXANDER I. J. (Eds), 1992 - **Mycorrhizas in Ecosystems**. ISBN 0 85198 786 9; Wallingford, Oxon OX10 8DE, United Kingdom : CAB International, 419 pp.

Comme le soulignent les éditeurs dans la préface, dans la nature, les racines de la plupart des plantes sont 'infectées' par des champignons pour former des mycorrhizes, des formations qui exercent un rôle primordial dans la capture des nutriments dans le sol. A ce jour, la biologie des symbioses mycorrhiziennes a fait l'objet d'un nombre important de recherches, exclusivement menées en conditions contrôlées en laboratoire ou en serre. Le temps était donc venu d'étendre ces recherches à des situations plus naturelles sur le terrain où se réalisent en fait, l'évolution et le fonctionnement 'normal' de ces symbioses particulières.

L'organisation du 3ème Colloque Européen sur les Mycorrhizes répond, en partie, au désir de compréhension des mécanismes naturels participant aux mycorrhizes. Ceci apparaît à la lecture des titres de la plupart des contributions présentées lors de cette réunion scientifique, qui s'est tenue du 19 au 23 août 1992, à l'Université de Sheffield en Grande-Bretagne.

Cet ouvrage issu de ce colloque traite de tout les types principaux de mycorrhizes. Les facteurs déterminant leur distribution dans les divers écosystèmes, allant des forêts boréales aux tropiques, sont examinés en profondeur. On trouve également les résultats des essais visant à accroître la productivité de certains écosystèmes par inoculation avec des symbiontes fongiques plus efficaces. Des articles importants considèrent l'apport des techniques analytiques les plus récentes dans l'étude du système champignon-hôte dans [redacted] globalité; d'autres passent en revue les observations relatives à la fonction mycorrhizienne dans le sol. Quelques contributions considèrent la capture des ions dans le sol par les hyphes mycéliens et les facteurs pouvant influencer leur transfert aux racines, puis aux cellules végétales. Enfin, les opinions récentes sur les liens fontionnels entre les associations fongiques des racines «mycorrhizes» et celles des tiges «mycophyllas» sont également débattues.

Les six premiers chapitres sont issus des présentations orales faites lors du colloque, le septième correspond aux résumés des posters présentés.

Le premier chapitre débat du statut et de la fonction des mycorrhizes arbusculaires-vésiculaires dans les écosystèmes au travers de neuf contributions. Cinq d'entre elles traitent de la physiologie de la nutrition de ces micro-organismes; deux autres détaillent le rôle des hyphes dans le

sol et l'étendue des infections mycorrhiziennes. Cette section introductive comporte également deux documents de synthèse correspondant, pour l'un à une étude comparative des mycophyllas et des mycorrhizes, pour l'autre à une présentation des particularités des espèces fongiques chez les Glomales.

Le second chapître, intitulé 'Ectomycorrhizes des écosystèmes forestiers tempérés et boréaux', rassemble neuf contributions. Certaines traitent des processus d'absorption et de translocation de nutriments, d'autres se focalisent sur le potentiel du mycélium, des rhizomorphes, des 'nattes' mycorrhiziques et des associations mixtes de champignons dans les racines. Les contributions restantes passent en revue les problèmes des potentialités des liaisons inter-plantes, d'incompatibilités somatiques ou présentent les tentatives d'inoculations en champ à grande échelle.

Le troisième chapitre s'intéresse aux mycorrhizes dans les écosytèmes perturbés, agricoles et successionnels. Cette section, comparativement la plus importante puisqu'elle rassemble douze contributions, couvre un grand nombre de sujets dans lesquels interviennent aussi bien les ecto- que les endomycorrhizes. Quatre articles traitent des effets des travaux mécaniques du sol dans les écosystèmes agricoles, prairies ou naturels, y compris en régions arides. Les problèmes liés aux perturbations des forêts, [redacted] la pollution atmosphérique ou à la succession des mycorrhizes sont également traités dans ce chapitre.

La quatrième partie débat des mycorrhizes des écosystèmes des landes et des bruyères, un sujet généralement peu abordé.

Le chapitre suivant s'interésse aux mycorrhizes des écosystèmes tropicaux en Afrique et en Indonésie où se réalisent d'importantes recherches sur les mycorrhizes des forêts de Diptero-carpacées.

Le sixième chapitre [redacted] pour titre: Écologie physiologique des mycorrhizes. Ses neuf contributions contiennent des informations sur l'assimilation de l'azote, l'effet des cations monovalents sur les flux de phosphates et les particularités des organes d'absorption des cations. Le rôle des canaux ioniques sur les échanges de solutés est largement débattu. On trouve également une analyse comparative de la production des IAA (indole 3-acide acétique) chez les champignons saprophytes, ectomycorrhiziens et ericoïdes. Sont également considérés le volet relations plantes-eau du sol, en rapport avec la sécheresse du sol chez les ectomycorrhizes et les activités protéiniques en tant que marqueurs des fonctions endomycorrhiziennes ches les plantes. Cette section comporte également des synthèses sur la diversité fondtionnelle des ecto- et des endomycorrhizes et, enfin, la structure des interfaces plantes-champignons chez les mycorrhizes vésiculaires-arbusculaires.

La septième partie rassemble les résumés des soixante posters présentés lors de ce colloque. Ceux-ci traitent des divers sujets abordés dans les contributions orales. On note cependant une focalisation des travaux menés sur les effets des polluants et des pluies acides sur l'hôte et ses mycorrhizes, la croissance des plants mycorrhizés en nurseries [redacted] en conditions naturelles et, enfin, sur les effets des fongicides sur les communautés des rhizosphères.

Cet ouvrage devrait interésser un éventail assez large de spécialistes, allant des mycologues et des phytopathologistes aux agents forestiers et écologues microbiens impliqués dans les recherches sur les liens sol-plantes dans les divers écosystèmes. La diversité des thèmes abordés [redacted] l'abondante bibliographie afférente à chaque article, permettra aux lecteurs de se mettre rapidement au courant des travaux réalisés à travers le monde dans les laboratoires où [redacted] réalisent des recherches sur ce groupe particulier de champignons. Par ailleurs, si le rôle crucial des mycorrhizes dans la nature n'est plus à démontrer, l'étude des espèces fongiques impliquées dans ces symbioses et des mécanismes phsiologiques particuliers auxquelles elles participent, devraient fournir des réponses aux multiples points d'interrogations que se posent encore les spécialistes de ce domaine. Des retombées intéressantes sont attendues des recherches futures dans ce domaine.

J. Mouchacca

PFLEGER F. L. & LINDERMAN R. G. : **Mycorrhizae and Plant Health.** The American Phytopathological Society, 3340 Pilot Road Knob, St. Paul, Minnesota 55121-2097, USA, 1994, 344 pp.

Les deux éditeurs commencent la préface de leur livre en rapportant l'affirmation suivante formulée une dizaine d'années auparavant par les Drs MARX et SCHENK, auteurs du livre "Problèmes provocateurs de santé végétale": "Chez la plupart des plantes, les mycorrhizes sont une composante naturelle des racines, de même que les chloroplastes sont des éléments essentiels des organes foliaires."

Cette affirmation avait conduit le comité Mycorrhize de la Socité Américaine de Phytopathologie à proposer d'organiser, en marge de la réunion annuelle de 1992 à Portland dans l'Oregon, un colloque sur le thème "Plantes Saines, Planète Saine". Objectif principal : informer les membres de la Société de l'importance croissante des mycorrhizes dans la santé des plantes, pour aller au delà de l'idée généralement admise, stipulant que les mycorrhizes améliorent la croissance végétale par un renforcement de l'absorption du phosphore du sol.

L'ouvrage proposé est une version élargie des contributions de ce Colloque; il met en relief le rôle crucial exercé par les mycorrhizes dans le développement des plantes saines sur la terre et l'élaboration de systèmes soutenables de productions agricoles et foretières. Son contenu traite essentiellement de la fonction des mycorrhizes en écologie végétale; en particulier des mycorrhizes vésiculaires arbusculaires (MVA), présentes dans la plupart des écosystèmes naturels ou cultivés.

Les neuf parties de cet ouvrage rassemblent quatorze contributions. Celles-ci traitent du rôle des MVA et des ectomycorrhizes dans la suppression des maladies végétales y compris une discussion sur les mécanismes des interactions entre mycorrhizes et pathogènes. Un thème d'actualité également abordé a trait au rôle des mycorrhizes dans les processus de réexploitation agricole de sites perturbés, suite à des activités telles que l'exploitation minière. Deux articles tentent d'évaluer les effets des pratiques usuelles en agriculture et en nurseries forestières sur les mycorrhizes; en particulier ceux concernant l'emploi des fertilisants, des pesticides et des désherbants ainsi que la politique relative au statut génétique des hôtes sélectionnés.

Les effets de la pollution atmosphérique sur la santé des plantes, à travers la connection mycorrhize, sont passés en revue dans une excellente contribution. Les correlations entre les MVA ou les ectomycorrhizes et la biogéochimie des sols, en relation avec les processus de recyclage des nutriments, font l'objet d'une analyse approfondie; celle-ci aborde les problèmes de la variation des particularités physiques du sol, suite à des modifications des taux d'aggrégation. Un chapitre est consacré à la systématique des champignons endomycorrhiziens du groupe des Glomales; un autre traite des approches moléculaires et génétiques pour la compréhension de la formation et du fonctionnement des mycorrhizes. Enfin, le dernier chapitre est un résumé général, rédigé par les deux éditeurs; c'est une synthèse des informations présentées mais il comporte aussi des suggestions pour des recherches futures dans ce domaine.

La parution de ce document ainsi que celui rassemblant les contributions du 3ème Colloque Européen des Mycorrhizes, devraient permettre une meilleure compréhension du rôle critique des mycorrhizes dans les écosystèmes végétaux. La publication simultanée de ces deux ouvrages confirme que la science des mycorrhizes est un domaine en expansion rapide, mais que beaucoup de questions restent encore sans réponses. Les résultats présentés sont une preuve tangible que cette discipline scientifique a dépassé le stade préliminaire; elle constitue maintenant un volet d'investigation devant être intégré dans toutes recherches menées sur des espèces végétales, toute disciplines confondues.

J. Mouchacca

WESSELS J.G.H. and MEINHARD F., 1994 - **The Mycota. I. Growth differentiation and sexuality.** Esser K. and Lemke P.A. eds, Springer Verlag, Paris.

En 1965 parut le premier volume du traité de Ainsworth & Sussman "The Fungi", sorte de bible des mycologues. Trente ans plus tard, Esser & Lemke ont voulu répondre à une demande des mycologues et biologistes contemporains en éditant un nouveau traité général sur la biologie des champignons.

La série "The Mycota" sera composée de 7 volumes qui sortiront entre 1994 et 1998. Elle se propose de répondre à trois questions fondamentales qui ressemblent à celles des années 65: que sont les champignons, que font-ils et quelle est leur importance par rapport à l'homme en cette fin de siècle?

Le premier volume: "Growth, differentiation and sexuality" est sorti en 1994, les 6 autres volumes sont prévus pour les années suivantes, jusqu'en 1998.

Il comporte deux parties principales traitant l'une des mécanismes de croissance végétative et l'autre des mécanismes reproducteurs. Les deux premiers chapitres sont consacrés au cycle cellulaire de *Saccharomyces cerevisiae* et *Schizosaccharomyces pombe*, deux levures très proches du point de vue taxonomique mais éloignées du point de vue évolutif. C'est justement à partir de cette analyse comparée que se discutent les caractéristiques conservées et non conservées des génes régulant le cycle cellulaire. Les deux chapitres suivant traient de la structure de l'hyphe dans son intégralité et de son fonctionnement. Le rôle du cytosquelette dans le mouvement des organelles, dans l'accroissement hyphal et dans la mitose est mis en évidence dans le troisième chapitre. Celui-ci constitue un bilan actuel des connaissances mais quelques questions restent encore posées sur le mécanisme précis de ces mouvements. La réponse à ces questions doit sans doute être recherchée aussi au niveau plus élevé des Eucaryotes. Des molécules telles que la kinésine et la dynéine pourraient constituer un début de réponse.

Le quatrième chapitre traite de la pression osmotique et de la régulation de la turgescence chez les champignons filamenteux. Sont exposés, d'une façon synthétique, les phénomènes généraux qui accompagnent la croissance, tels que l'absorption de l'eau, les mécanismes de contrôle de la dilution et de la déshydratation. Les mécanismes de régulation du potentiel osmotique sont discutés chez deux exemples de champignons d'écologie extrême (*Dendryphiella salina* et *Saprolegnia* sp.) et, avec moins de détail, chez les champignons non aquatiques. Le chapitre 5 traite aussi des aspects biophysiques de la répartition des systèmes de transport tout au long de la membrane plasmique et ses conséquences physiologiques dans l'accroissement polarisé. L'auteur a des concepts très personnels et suggère des expérimentations non conventionnelles pour avancer dans la connaissance du sujet. Le chapitre 6 apporte quelques détails nouveaux sur la biogenèse de la paroi cellulaire mais rien d'essentiel par rapport à ce ui est déjà publié par ailleurs. Le chapitre 7 focalise sur la biogenèse de la paroi apicale. L'hypothèse d'excrétion d'enzymes à travers les parois des ramifications formées au cours de l'idiophase est particulièrement intéressante. Le chapitre 8 porte sur le dimorphisme forme levure-forme filamenteuse comme moyen d'adaptation. Le chapitre 9 est une révision sur les phénomènes de translocation chez les organes végétatifs tels que les rhizomorphes et les fructifications de basidiomycètes. Les chapitres 10 et 11 traitent de la régulation de la croissance (entension, ramification) et de la sénescence. Des rapprochements entre les cellules cancéreuses et certains types de cellules fongiques qui échappent à la sénescence sont discutés de façon fort intéressante. Le chapitre 12 est consacré à l'incompatibilité sexuelle hétérogénique et les auteurs proposent une modification du concept d'espèce biologique. Le chapitre 13 ouvre la deuxième partie du volume. Ce chapitre et les suivants sont consacrés à la régulation de la méiose et de la sporulation de *Saccharomyces cerevisiae* et *Schizosaccharomyces pombe* tandis que le chapitre 15 porte sur les mêmes phénomènes chez les champignons filamenteux. Le chapitre 16 revient sur les levures et les conclusions générales sur l'homothalisme sont intéressantes. Les trois chapitres suivants portent sur

l'étude des gènes et des mécanismes moléculaires déterminant la sexualité chez les Asco- et Basidiomycètestes. Les chapitres 20, 21 et 22 abordent la question des mécanismes de contrôle et l'accomplissement de la morphogenèse des ana- et téléomorphes. Les derniers trois chapitres concernent enfin l'étude des activités des phéromones dans le contrôle de la différenciation sexuelle chez les levures et les champignons filamenteux.

On remarque, comme cela est fréquent dans ce type d'ouvrages écrit par plusieurs auteurs, que les mêmes thèmes sont repris dans des optiques différentes dans plusieurs chapitres. Malgré quelques redondances, l'ensemble de ce premier volume est fort intéressant et nous conduit à attendre impatiemment la parution des suivants. Ils constitueront sans doute, dans leur ensemble, une base de référence pour les chercheurs et les enseignants en mycologie.

L. Bettucci

Commission paritaire 16-1-1986 - N° 58611 - Dépôt légal 3ᵉ trimestre 1995 - Imprimerie F. Paillart
Sortie des presses le 30 septembre 1995 - Imprimé en France
Éditeur : A.D.A.C. (Association des Amis des Cryptogames)
Président : D. Lamy ; Secrétaire : B. Dennetière
Trésorier : B. de Reviers ; Directeur de la publication : H. Causse



CRYPTOGAMIE

LE PÉRIODIQUE FRANÇAIS CONSACRÉ A LA CRYPTOGAMIE

CRYPTOGAMIE est un périodique édité par l'A.D.A.C. (Association des Amis des Cryptogames), dont le siège est au Laboratoire de Cryptogamie du Muséum National d'Histoire Naturelle. Les chercheurs de tous pays y publient leurs travaux en français, allemand, anglais, espagnol et italien, après accord des Comités de Lecture constitués de spécialistes de réputation internationale.

CRYPTOGAMIE propose trois sections:

Cryptogamie, Algologie
Cryptogamie, Mycologie
Cryptogamie, Bryologie-Lichénologie

Chaque section publie 4 numéros par an (tirage: 450 exemplaires).

THE FRENCH JOURNAL DEVOTED TO CRYPTOGAMY

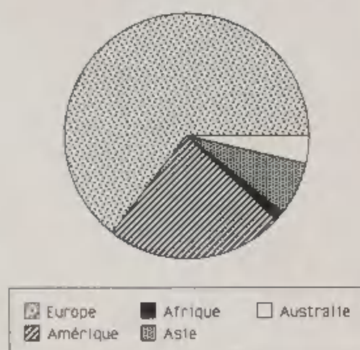
CRYPTOGAMIE is a periodical published by A.D.A.C. (Association des Amis des Cryptogames), settled at Laboratoire de Cryptogamie, Muséum National d'Histoire Naturelle. Research workers from the whole world publish their papers in French, German, English, Spanish and Italian, after acceptation by a selection commettee that comprises experts of international renown.

CRYPTOGAMIE offers to its subscribers three sections:

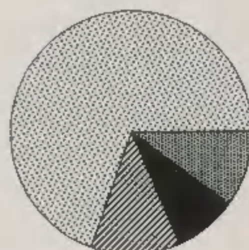
Cryptogamie, Algologie
Cryptogamie, Mycologie
Cryptogamie, Bryologie-Lichénologie

Each section publishes 4 numbers a year (printing: 450 ex.).

Diffusion de CRYPTOGAMIE

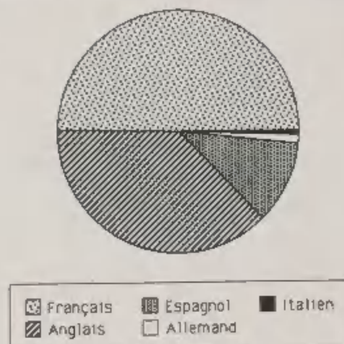


Origine des 453 articles publiés de 1986 à 1991



Europe
Afrique
Amérique
Asie

Répartition des articles publiés de 1986 à 1991 selon la langue



Source : MNHN, Paris

SOMMAIRE

Cryptogamie, Mycol. 1995, 16 (3). 141-242.